

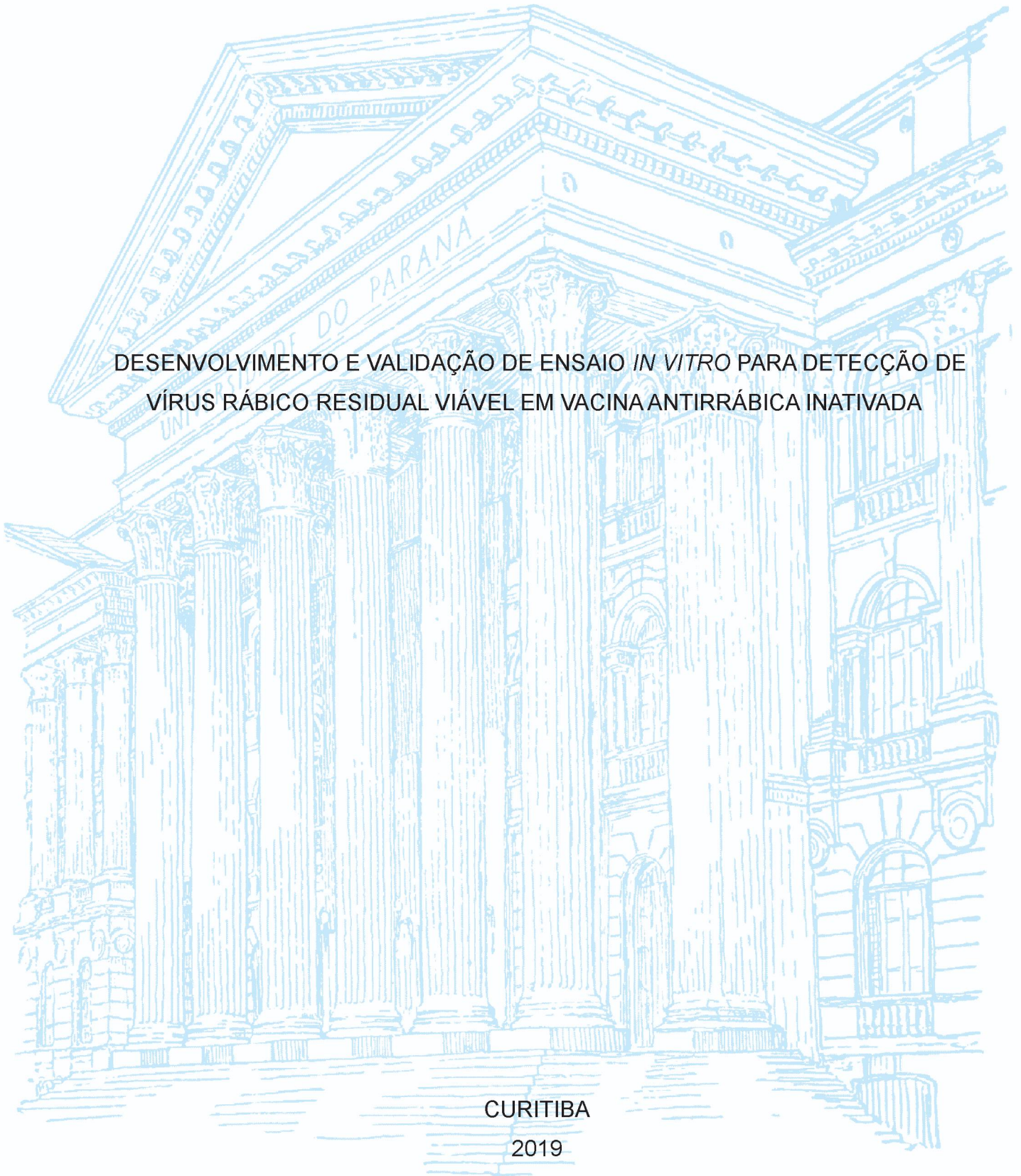
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ LOURENÇO CORREIA MOREIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA DETECÇÃO DE
VÍRUS RÁBICO RESIDUAL VIÁVEL EM VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA

CURITIBA

2019



BEATRIZ LOURENÇO CORREIA MOREIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA DETECÇÃO DE
VÍRUS RÁBICO RESIDUAL VIÁVEL EM VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Moreira, Beatriz Lourenço Correia

Desenvolvimento e validação de ensaio *in vitro* para detecção de vírus
rábico residual viável em vacina antirrábica inativada. / Beatriz Lourenço
Correia Moreira. – Curitiba, 2019.

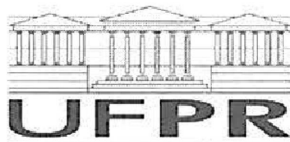
126 p.: il.

Orientador: Sonia Mara Raboni

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. Raiva 2. Vacinas antirrábicas 3. Inativação de vírus I. Título II.
Raboni, Sonia Mara III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

CDD (22. ed.) 615.563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de BEATRIZ LOURENCO CORREIA MOREIRA intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RÁBICO RESIDUAL VIÁVEL EM VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2019.

SONIA MARA RABONI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ELIANA BLINI MARENGO

Avaliador Externo (IBU)

JULIANO BORDIGNON

Avaliador Externo (ICC)

Dedico esta dissertação à minha mãe Tânia pelo exemplo de que nunca é tarde para buscar conhecimento, ao meu pai Alceu e madrastra Elisabeth pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e ao meu marido André por acreditar em mim sempre.

Também dedico à minha orientadora Dra. Sonia Mara Raboni, por sua competência, atenção e coragem de entrar em uma área pouco explorada.

AGRADECIMENTOS

À colega de pós-graduação Luciana pela constante ajuda e colaboração durante a realização deste trabalho. E às demais colegas que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto.

Aos colegas Ana Paula e Jorge pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao gerente Aurélio do Centro de Desenvolvimento e Produção de Imunobiológicos, TECPAR, por acreditar na importância deste estudo.

Aos colaboradores do Centro de Desenvolvimento e Produção de Imunobiológicos, TECPAR, pois sem eles este trabalho não seria possível.

Ao Dr. Luis Gustavo Morello e ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP, pelo auxílio na produção dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

RESUMO

A raiva, uma zoonose viral, causa cerca de 60 mil mortes anuais, sendo os cães responsáveis por 99% da transmissão para humanos. No entanto, a raiva humana é prevenível por meio da vacinação de cães e da profilaxia pós-exposição em humanos utilizando vacinas antirrábicas inativadas. Durante sua produção, vários ensaios obrigatórios de controle de qualidade *in vivo*, como potência, vírus vivo residual e inocuidade são responsáveis pela utilização de grande quantidade de animais. Ao longo dos últimos anos, organizações mundiais têm estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos para substituir, reduzir ou refinar a utilização de animais na indústria farmacêutica. Este projeto propõe desenvolver e validar um ensaio *in vitro* em substituição ao ensaio *in vivo* para a determinação de vírus vivo residual, combinando técnicas de isolamento viral com leitura por imunofluorescência direta em placa e quantificação viral por método molecular. A padronização das etapas de recuperação viral e quantificação por RT-qPCR foram realizadas e o ensaio combinado mostrou-se 3 vezes mais sensível que o ensaio *in vivo*. Foi possível identificar amostras de suspensão viral anteriormente liberadas pelo controle interno, com partículas de vírus rábico ainda viáveis, comprovando a importância da implantação deste método no controle interno da produção da vacina antirrábica. Além disso, o ensaio desenvolvido é mais prático, barato e produz resultados mais rapidamente, em apenas 4 dias, o que pode possibilitar maior agilidade no controle de qualidade interno da vacina. O método *in vitro* poderá reduzir 2/3 da quantidade de animais de laboratórios utilizados para esse fim, uma vez que pode ser implantado no controle de qualidade intermediário da produção da vacina rábica inativada.

Palavras-chave: Raiva. Vacina antirrábica inativada. Ensaio de inativação viral.

Imunofluorescência direta; RT-qPCR.

ABSTRACT

Rabies, a viral zoonosis, causes nearly 60,000 annual deaths, with dogs accounting for 99% of transmission to humans. However, human rabies is preventable through dog vaccination and pre-exposure prophylaxis in humans, using inactivated rabies vaccines. During their production process, several mandatory *in vivo* quality control trials, such as potency, live virus and safety are responsible for the use of large numbers of laboratory animals. Over the last few years, global organizations have been encouraging the development of alternative methods to reduce, replace and refine the use of animals in the pharmaceutical industry. This study proposes the development and validation of an *in vitro* assay replacing the *in vivo* assay for the determination of residual live virus combining viral isolation techniques with direct immunofluorescence detection and viral quantification by a molecular method. Standardization of viral recovery steps and quantification by RT-qPCR were performed, and the combined method was shown to be 3 fold more sensitive than the *in vivo* assay. It was possible to identify viral suspensions samples, previously released by the *in vivo* internal controls, which still had residual viable rabies virus particles, proving the importance to implement this method as an internal quality control of rabies vaccine production. In addition, the assay developed is more practical, cheaper and produces results more quickly, in just 4 days, which may allow greater agility in the internal quality control of the vaccine. The *in vitro* method may reduce 2/3 of the amount of laboratory animals used for this purpose, since it can be implemented in the intermediate quality control of inactivated rabies vaccine production,

Keywords: Rabies. Inactivated rabies vaccine. Inactivation test. Immunofluorescence assay. RT-qPCR

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLOS DE ACHADOS PATOLÓGICOS EM TECIDO CEREBRAL INFECTADO COM RAIVA.	19
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÕES DO VÍRUS RÁBICO.....	21
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA.	27
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES: ETAPA 1 EM AZUL, ETAPA 2 EM VERDE E ETAPA 3 EM LARANJA.	40
FIGURA 5 – GARRAFA SPINNER PARA CULTIVO DE CÉLULAS BHK-21.	42
FIGURA 6 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SFB SUPLEMENTADO AO MEIO DE CULTIVO.	62
FIGURA 7 – ANÁLISE DE VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO PARA ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO.	63
FIGURA 8 – ANÁLISE DE VARIAÇÃO DE TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO.....	64
FIGURA 9 – ENSAIO DE LIMITE DE DETECÇÃO DE RECUPERAÇÃO VIRAL.	65
FIGURA 10– IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DA PLACA CONTENDO 10-2 TCID ₅₀ /ML DE VRT.....	66
FIGURA 11– AVALIAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE VACINA EM ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO.....	67
FIGURA 12– ENSAIO DE COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE ENTRE OS MÉTODOS IN VITRO E IN VIVO DE RECUPERAÇÃO VIRAL.	68
FIGURA 13– AMPLIFICAÇÃO DO GENE RABVGP1 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INICIADORES E SONDA DO GRUPO 1....	69
FIGURA 14– AMPLIFICAÇÃO DO GENE RABVGP1 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INICIADORES E SONDA DO GRUPO 2....	70
FIGURA 15– CURVA PADRÃO PARA O GENE RABVGP1 COM OS INICIADORES E SONDA DO GRUPO 1 E COMPARAÇÃO DAS REAÇÕES SINGLEPLEX E DUPLEX.	71
FIGURA 16– RESULTADO DA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE LINEARIDADE DA REAÇÃO DE RT-qPCR.....	72

FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VÍRUS RÁBICO VIÁVEL E INATIVADO.....	74
FIGURA 18 – AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL IN VITRO COM QUANTIFICAÇÃO POR RT-qPCR.	75
FIGURA 19 – CULTIVO CELULAR E RT-qPCR – VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL IN VITRO.	78
FIGURA 20 – CULTIVO CELULAR DE VÍRUS RÁBICO – CONTROLES NEGATIVO E POSITIVO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL IN VITRO. ..	79
FIGURA 21 – CULTIVO CELULAR DE VÍRUS RÁBICO – AMOSTRAS DE SUSPENSÃO VIRAL INATIVADA DE ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL IN VITRO.....	80
FIGURA 22 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – CONTROLE NEGATIVO.	82
FIGURA 23 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – CONTROLE POSITIVO.....	83
FIGURA 24 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – AMOSTRA SVI-.	84
FIGURA 25 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – AMOSTRA SVI+.	85
FIGURA 26 – ENSAIO IN VIVO DA ATIVIDADE VIRAL – COMPARAÇÃO DE CAMUNDONGOS.	87
FIGURA 27 – TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA COM AMOSTRAS SVI- E SVI+.	88
FIGURA 28 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – CONTROLE NEGATIVO.....	90
FIGURA 29 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – CONTROLE POSITIVO.	91
FIGURA 30 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – AMOSTRA SVI-.	92
FIGURA 31 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – AMOSTRA SVI+.	93

FIGURA 32– HISTOLOGIA DE CAMUNDONGO CONTROLE NEGATIVO DO ENSAIO IN VIVO.	95
FIGURA 33– HISTOLOGIA DE CAMUNDONGO CONTROLE POSITIVO DO ENSAIO IN VIVO.	95
FIGURA 34– HISTOLOGIA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRAS DE SVI- DO ENSAIO IN VIVO.	96
FIGURA 35– HISTOLOGIA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRAS DE SVI+ DO ENSAIO IN VIVO.	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS ENSAIOS EXIGIDOS PARA O CONTROLES DE QUALIDADE DE VACINAS ANTIRRÁBICAS.	32
TABELA 2 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO.	53
TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DOS INICIADORES E SONDA UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE RT-qPCR PARA O GENE RABVGP1.	54
TABELA 4 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS BHK-21 EM DISTINTOS PERÍODOS DE TEMPO.....	61
TABELA 5 – ENSAIO DE SUBCULTIVO CELULAR PARA POTENCIALIZAÇÃO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	64
TABELA 6 – RESULTADOS DE REPETIBILIDADE INTER E INTRA-ENSAIOS E LIMITE DE DETECÇÃO DA REAÇÃO DE RT-qPCR.	72
TABELA 7 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DUPLEX DE RT-qPCR PARA RABV-ATCB.	73
TABELA 8 – AVALIAÇÃO DE REAÇÃO DE RT-qPCR COMBINADA COM O MÉTODO DE RECUPERAÇÃO VIRAL IN VITRO.....	75
TABELA 9 – VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL IN VITRO. ...	77

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1.	RAIVA	16
2.1.1.	Agente etiológico	20
2.2.	VACINAS ANTIRRÁBICAS.....	22
2.2.1.	Produção de vacina antirrábica inativada em cultivo celular.....	26
2.2.2.	Inativação viral	28
2.2.3.	Controle de qualidade.....	29
2.3.	MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA CONTROLE DE QUALIDADE	33
2.3.1.	Isolamento viral em cultivo celular	34
2.3.2.	Métodos moleculares para quantificação viral	34
2.3.3.	Aplicação dos 3Rs no controle de qualidade de vacinas antirrábicas	36
3.	JUSTIFICATIVA.....	38
4.	OBJETIVO.....	39
4.1.	OBJETIVO GERAL	39
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5.	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1.	DESENHO DO ESTUDO.....	40
5.2.	AMOSTRAS.....	41
5.3.	CULTIVO CELULAR.....	41
5.4.	PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL INATIVADA EM BIORREATORES	42
5.5.	PRODUÇÃO DE VÍRUS RÁBICO DE TRABALHO EM GARRAFA <i>SPINNER</i>	43
5.6.	DETECÇÃO VIRAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA EM LÂMINA.....	44
5.7.	ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL <i>IN VIVO</i>	45
5.8.	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL <i>IN VITRO</i>	46
5.8.1.	Padronização da concentração celular	47
5.8.2.	Determinação de concentração de SFB ideal de cultivo	48
5.8.3.	Determinação de temperatura ideal de cultivo.....	48
5.8.4.	Determinação de tempo de incubação ideal de cultivo.....	48
5.8.5.	Avaliação de subcultura para potencialização da recuperação viral.....	49

5.8.6.	Determinação de limite de detecção.....	50
5.9.	AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DA VACINA ANTIRRÁBICA	50
5.10.	COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE ENTRE OS ENSAIOS DE VÍRUS VIVO RESIDUAL <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	51
5.11.	ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR	51
5.11.1.	Extração do material genético	51
5.11.2.	RT-qPCR pelo método de detecção TaqMan	52
5.11.3.	Desenho dos iniciadores e sondas	52
5.11.4.	Padronização do RT-qPCR	54
5.12.	VALIDAÇÃO INICIAL DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL <i>IN VITRO</i>	55
5.13.	IDENTIFICAÇÃO VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	56
5.14.	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS RÁBICO	57
5.15.	HISTOLOGIA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS INFECTADAS COM VÍRUS RÁBICO	58
5.16.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
6.	RESULTADOS.....	60
6.1.	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL EM CULTIVO CELULAR	60
6.1.1.	Determinação de concentração ideal de células BHK-21	60
6.1.2.	Determinação de condições ótimas de meios e suplementos para o cultivo celular	62
6.1.3.	Análise de subcultivo para potencializar a replicação viral	64
6.1.4.	Determinação de limite de detecção de recuperação viral <i>in vitro</i> com distintas concentrações virais	65
6.2.	AVALIAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE VACINA ANTIRRÁBICA VETERINÁRIA.....	66
6.3.	COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE ENTRE O MÉTODO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	67

6.4.	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR MÉTODO MOLECULAR.....	69
6.5.	AVALIAÇÃO DE VÍRUS RÁBICO VACINAL INATIVADO POR MÉTODO MOLECULAR	73
6.6.	COMBINAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL COM RT-qPCR.	74
6.7.	VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL <i>IN VITRO</i>	76
6.8.	IDENTIFICAÇÃO VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO CULTIVO CELULAR	81
6.9.	ENSAIO <i>IN VIVO</i> PARA CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE VIRAL	86
6.9.1.	Ensaio <i>in vivo</i>	86
6.9.2.	Teste de imunofluorescência direta para confirmação da infectividade viral	87
6.9.3.	Análise por microscopia eletrônica de transmissão das amostras biológicas	89
6.9.4.	Análise por histologia das amostras biológicas	94
7.	DISCUSSÃO	97
8.	CONCLUSÕES	107
9.	PERSPECTIVAS	108
10.	PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	109
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO 1	– APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ.....	118
ANEXO 2	– CHECK-LIST PARA O ENSAIO DE INATIVAÇÃO VIRAL <i>IN VITRO</i>	120
ANEXO 3	– CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL NA II CONFERÊNCIA PANAMERICANA PARA MÉTODOS ALTERNATIVOS	122
ANEXO 4	– CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NA II CONFERÊNCIA PANAMERICANA PARA MÉTODOS ALTERNATIVOS	123
ANEXO 5	– CERTIFICADO DE RECEBIMENTO DE GRATIFICAÇÃO “ <i>YOUNG SCIENTIST TRAVEL AWARD</i> ” NO XXI CONGRESSO EM ALTERNATIVAS PARA TESTES EM ANIMAIS	124
ANEXO 6	– CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO XXI CONGRESSO EM ALTERNATIVAS PARA TESTES EM ANIMAIS	125

ANEXO 7 – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO À REVISTA <i>JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS</i>	126
--	-----

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma das doenças mais antigas conhecidas pela sociedade e, ainda hoje, é responsável por cerca de 60 mil mortes em humanos por ano. É uma zoonose viral capaz de infectar todas as espécies de mamíferos, causando uma encefalopatia grave e letal.

O vírus rábico (RABV), pertencente à família *Rhabdoviridae*, é um RNA vírus de fita simples, que codifica para cinco proteínas com propriedades estruturais e funcionais, capaz de infectar células nervosas. Sua principal forma de transmissão é pelo contato de saliva contendo partículas virais de indivíduos infectados com tecido sadio de outros animais por meio de mordedura, arranhadura ou lambedura. O período de incubação viral é bastante variável e não apresenta viremia. O aparecimento de sinais e sintomas não específicos como febre, parestesia, formigamento e ansiedade ocorre cerca de 30 dias após a mordida, culminando em sintomas neurológicos graves como agressividade, hidrofobia e coma, levando ao óbito em torno de 7 a 10 dias após o início dos sintomas.

Não existe tratamento efetivo para a raiva, uma vez que os sintomas aparecem, a doença tem progressão rápida e fatal, com exceção de apenas alguns casos de cura no mundo, porém com sequelas neurológicas importantes. As únicas formas de prevenção são a vacinação de pessoas em áreas ou atividades de risco, dos vetores mais comuns, como cães e gatos, e a profilaxia pós-exposição em humanos junto com a administração de soro antirrábico. Ambas as estratégias de prevenção fazem uso da vacina antirrábica inativada produzida principalmente em cultivo celular.

Um dos principais ensaios de controle de qualidade durante a produção deste tipo de vacina é a detecção de vírus residual que é feita em camundongos. Além desse, outros ensaios para avaliação de potência e segurança da vacina também são responsáveis pela utilização de grande quantidade de animais.

Visando a substituição, redução ou refinamento do emprego de animais de laboratório na indústria farmacêutica, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de novos ensaios que utilizam técnicas *in vitro* com propósitos similares ao método *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. RAIVA

A raiva é uma das doenças mais antigas já estudadas pela humanidade, com registros na literatura desde século 4 A.C. onde seu aparecimento era descrito como espontâneo a partir de situações de estresse do cachorro, conceito que perdurou por séculos (FRACASTORO, 1546). Vários avanços ocorreram ao longo dos anos para um melhor entendimento da doença e alguns tratamentos foram propostos, mas somente em 1884, na França, Pasteur conseguiu isolar o vírus e assim desenvolver a vacina antirrábica que estabeleceu o conceito de profilaxia pós-exposição (PAGET, 1914).

A doença é caracterizada por uma encefalite viral aguda que acomete todas as espécies de mamíferos, incluindo humanos, de evolução rápida e fatal, porém ainda negligenciada em grande parte do planeta (DACHEUX et al., 2008). É uma zoonose ou antropozoonose, doença primária em animais que pode ser transmitida aos humanos, que está entre as dez mais importantes do mundo (WHO, 2013). É uma doença endêmica em 150 países, presente em todos os continentes, com exceção da Antártica, Austrália e algumas ilhas isoladas. Estima-se que seja responsável por 60 mil mortes de humanos anualmente, 95% delas na Ásia e África, sendo que as vítimas mais frequentes são crianças entre 5 e 14 anos. (WHO, 2015). Entretanto, este número pode estar subestimado em decorrência de sistemas de vigilância e laboratórios não existentes ou inadequados, além da probabilidade de ser confundida com encefalopatias causadas por outros vírus, como herpesvírus 1 e 2, enterovirus, parvovírus B19, entre outros (JACKSON; WUNNER, 2002, DACHEUX et al., 2008). No Brasil, no período de 2010 a 2018 foram registrados 36 cases de raiva humana, 11 deles em 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A mais importante via de transmissão da raiva é a mordedura, sendo a saliva o veículo de inoculação viral (DACHEUX et al., 2016). Porém, outras vias menos conhecidas podem ocorrer: administração de vacina não inativada corretamente (PARÁ, 1965), transplante de órgãos contaminados (MAIER et al., 2010; NOAH et al., 1998; VETTER et al., 2011), transmissão por via placentária (SIPAHIOGLU; ALPAUT, 1985), dispersão de aerossol em ambientes laboratoriais ou cavernas com

grande concentração de morcegos (IRONS et al., 1957) e o consumo de carne ou leite de animais infectados (FAYE et al., 2017; JACKSON, 2013).

No mundo, principalmente Ásia e África, o principal reservatório é o cão, apresentando as variantes 1 e 2 do RABV, e em segundo lugar está o gato, apresentando a variante 3 do RABV, por vezes relacionada com variantes de morcegos, uma vez que gatos podem caçá-los (LEMBO et al., 2011; WHO, 2017). Já em áreas onde a doença em animais domésticos é controlada, como no Brasil, morcegos hematófagos e não hematófagos, assim como outros animais silvestres atuam como principais reservatórios (MAHADEVAN et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O risco de desenvolver a doença depende de vários fatores, como a severidade e local da lesão, se ocorreu em numa região com maior ou menor inervação, o animal agressor e consequente variante do vírus e sua quantidade na saliva/inoculado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WHO, 2017).

O controle da raiva canina pode ser obtido através de campanhas de vacinação da população de rua e, segundo a WHO, com 70% desta população vacinada anualmente já se consegue um controle eficaz da transmissão cão-a-cão (WHO, 2013a) sendo este um método capaz de reduzir a raiva humana e maior custo-efetivo do que o tratamento pós-exposição (IVES; DIEUZY-LABAYE; ABELARIDDER, 2018). Com esta ação, várias regiões já estão declaradas livres de raiva, como a Austrália, Havaí, Inglaterra e os Países Nórdicos (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007).

O vírus rábico é neurotrópico, causa infecção aguda do sistema nervoso central (SNC). Primeiramente o vírus infecta células do tecido muscular no local da lesão e, após sua multiplicação inicial, se utiliza das junções neuromusculares para invadir o sistema nervoso e assim se disseminar no SNC, evitando a barreira hematoencefálica e contornando a resposta imune. Em razão desta via de infecção, não há o aparecimento de viremia. Uma vez nos nervos motores periféricos ascendentes, adentra a medula espinhal e se dissemina no SNC, por último se dissemina para outros locais no organismo pelos nervos descendentes. O principal órgão afetado neste estágio da doença é a glândula salivar, onde muitas vezes o título viral na saliva é maior do que no tecido neural (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015; MAHADEVAN et al., 2016).

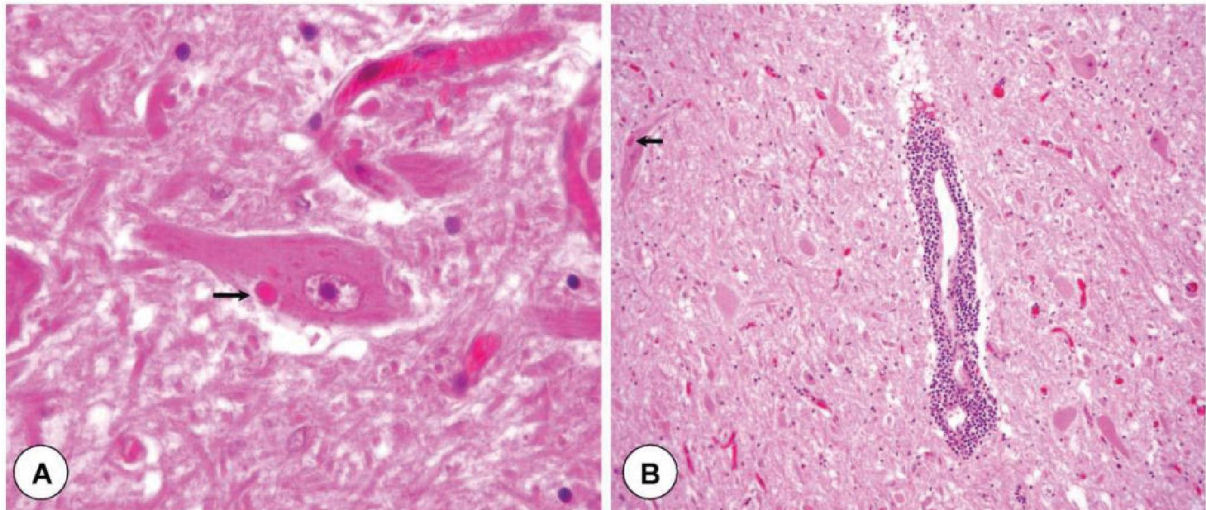
Apesar de grave e fatal, a raiva não apresenta sintomatologia específica, apenas alterações comportamentais agudas. O período de incubação viral é variável, entretanto, após o aparecimento dos sintomas, a progressão da doença é rápida, levando apenas alguns dias para a morte do animal ou humano. Os sintomas neurológicos mais característicos da raiva clássica são hiperexcitabilidade, febre alta, hipersalivação, sudorese, piloereção, pupilas dilatadas e, principalmente, a hidrofobia, desenvolvida em 50 a 80% dos pacientes, causando a desidratação severa. Este é um marcador decisivo para a doença, uma vez que não acontece em outras neuropatias (MAHADEVAN et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WHO, 2017).

Assim como nos animais, os humanos também podem desenvolver a raiva parálitica, o que acontece em 20% dos casos, com a possibilidade de estar associada a variantes de morcegos (MAHADEVAN et al., 2016). A fraqueza muscular proeminente é o sintoma inicial, com outros sintomas relacionados como dor, parestesia e prurido no local da lesão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Na raiva clássica o paciente evolui para paralisia, falência múltipla dos órgãos e óbito cerca de 15 dias a partir do aparecimento dos sintomas. Já na raiva parálitica, a fraqueza muscular evolui para paralisia muscular respiratória e, conseqüentemente, morte, porém o paciente sobrevive por mais tempo, sendo possível chegar a 30 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WHO, 2017).

Pacientes com raiva apresentam neurônios picnóticos ou cromatolíticos, caracterizando degeneração neuronal, eliminados através de apoptose ou por reação inflamatória local mediada por células da micróglia. Outra característica importante é a presença de corpúsculos de Negri, inclusões eosinofílicas virais intracitoplasmáticas facilmente reconhecidas com a coloração hematoxilina-eosina, marcador patognomônico da raiva, com alto valor diagnóstico desta infecção (Figura 1). Estudos demonstraram que os corpúsculos de Negri são estruturas funcionais com papel central na infecção viral. (LAHAYE et al., 2009; SINGH et al., 2017).

FIGURA 1: EXEMPLOS DE ACHADOS PATOLÓGICOS EM TECIDO CEREBRAL INFECTADO COM RAIVA.



FONTE: SINGH et al., 2017.

LEGENDA: A- corpos de Negri em neurônio infectado com vírus rábico (aumento de 400x); B- cérebro infectado com vírus rábico mostrando degeneração neuronal com infiltração de células mononucleares e edema (aumento de 200x).

Apesar de ser fatal, a raiva pode ser controlada pela profilaxia pré e pós-exposição com vacinas e imunoglobulinas específicas para esse fim (WHO, 2017). A profilaxia pré-exposição (PPRE) é indicada para indivíduos com risco de exposição à doença, como veterinários, trabalhadores de laboratórios e indústrias de fabricação de vacina, crianças em áreas endêmicas, viajantes com destino às áreas de alto risco, entre outros, nestes a titulação viral de anticorpos neutralizantes deve ser controlada a cada seis meses (FOOKS; BANYARD; ERTL, 2018; WHO, 2013b).

A profilaxia pós-exposição (PPE) com vacina e imunoglobulinas antivírus rábico (soro antirrábico) é a única medida eficaz para prevenir o desenvolvimento da raiva, mas somente se administrado corretamente. No mundo, cerca de 15 milhões de pessoas são submetidas à PPE por ano em decorrência de exposição potencial ao vírus rábico (WHO, 2015).

Após o início dos sintomas, as chances de cura são quase irrelevantes, com apenas alguns casos registrados no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a). Após estudo realizado por Lockhart e colaboradores em 1992 que observaram o potencial inibitório da quetamina sobre a replicação viral, um grupo de médicos norte-americanos desenvolveu um protocolo de tratamento, intitulado Protocolo de *Milwaukee*, que consiste no uso de antivirais, indução do coma e suporte de vida

para a tentativa de curar a raiva, mas com pouco sucesso até o presente momento (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992; WILLOUGHBY et al., 2005).

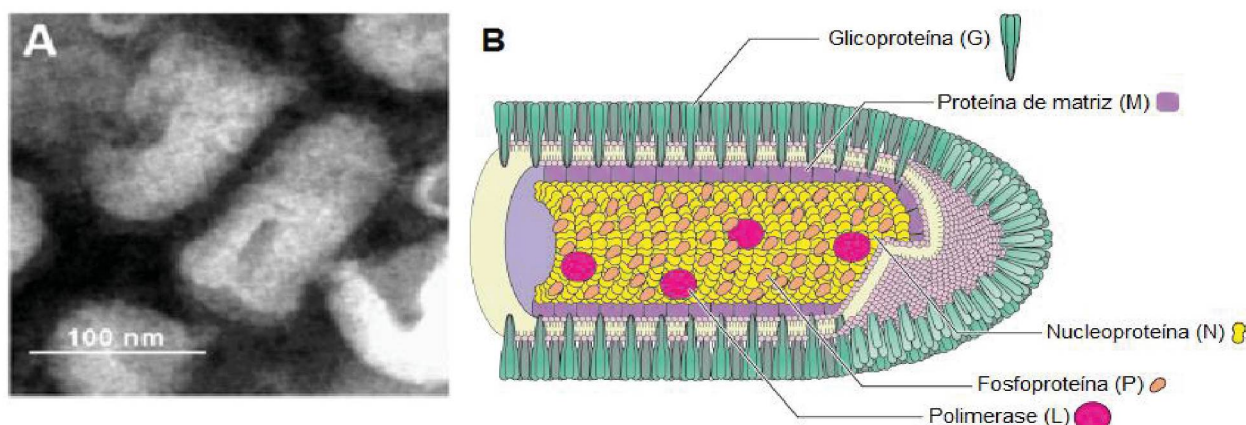
No Brasil, houve um caso de cura em 2008, mas com sequelas neurológicas graves como retardo mental e motor, onde foi utilizado o referido protocolo com algumas alterações. A partir deste caso foi estabelecido o Protocolo de Recife, com a utilização de amantadina e biopterina, que foram empregados nos casos brasileiros de raiva humana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a). Em 2018 este protocolo obteve mais um caso de sucesso, onde novamente um menino de 14 anos foi infectado por morcego, mas conseguiu sobreviver após tratamento intensivo, porém com graves sequelas neurológicas (VERDELIO, 2019).

2.1.1. Agente etiológico

O vírus rábico pertence ao gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, que contém 16 genótipos, sendo o RABV o vírus protótipo causador da encefalomielite rábica, porém outras espécies também causam doença tipo-raiva fatal (DACHEUX et al., 2016; DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015; DIETZGEN et al., 2017; FOOKS; BANYARD; ERTL, 2018; OIE, 2013).

O RABV é composto principalmente de RNA (2-3 %), proteínas (67-74%), lipídeos (20-26%) e carboidratos (3%), tendo formato de projétil, medindo aproximadamente 170 nm de comprimento e 70 nm de largura (Figura 2 – A) (SINGH et al., 2017). Este vírus, caracterizado como envelopado, tem RNA genômico de cerca de 12 kb, não segmentado, de fita simples com polaridade negativa que codifica 5 proteínas, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L), conforme Figura 2 - B (XU et al., 2015; ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2016).

FIGURA 2: REPRESENTAÇÕES DO VÍRUS RÁBICO.



FONTE: A- XU et al., 2015; B- Adaptado de DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015.

LEGENDA: A- microscopia eletrônica do RABV; B- representação esquemática do vírus rábico com suas proteínas.

O nucleocapsídeo do vírus rábico consiste do RNA genômico associado à proteína N formando um complexo helicoidal N-RNA (ITO; MOSELEY; SUGIYAMA, 2016). A nucleoproteína é a mais conservada em relação à sequência de aminoácidos, com 80 a 92% deles iguais dentre os sete genótipos virais conhecidos. Essa estabilidade está relacionada à sua função, encapsulamento do material genético e proteção contra ribonucleases. Por esse motivo o gene que codifica a proteína N é utilizado para identificar os diferentes genótipos pela técnica de biologia molecular RT-PCR (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991). A proteína N também é responsável por ativar a resposta imune em humanos, induzindo a imunidade protetora entre outras respostas imunes específicas, sendo considerado um superantígeno exógeno (LAFON et al., 1992).

A fosfoproteína pode ser encontrada em várias formas de fosforilação e sua principal característica é ser multifuncional. No início da produção viral nas células infectadas ela se complexa à nucleoproteína para impedir que esta se polimerize ou se ligue não especificamente à outras proteínas celulares; ao se complexar com a N, também a direciona para o encapsulamento do RNA (MAVRAKIS et al., 2003).

A proteína L é o componente catalítico do complexo RNA polimerase, realizando a transcrição e replicação do material genético viral. Assim que o RNA genômico viral é liberado no interior da célula do hospedeiro, a polimerase é responsável pela transcrição inicial, começando a replicação viral (BANARJEE; CHATTOPADHYAY, 1990; POCH et al., 1990).

A proteína M é a menor das proteínas virais e forma uma capa que envolve o nucleocapsídeo e media seu envelopamento, resultando na estrutura em forma de projétil apresentada pelo vírus (ITO; MOSELEY; SUGIYAMA, 2016).

O envelope viral é composto de uma bicamada lipídica que contém a glicoproteína G transmembrânica exposta na superfície da membrana em formato de espinhos, formador por trímeros da proteína (DUARTE, 2005; XU et al., 2015). Sua porção C-terminal, localizada no interior da partícula viral, interage com a proteína de matriz e completa a montagem do vírus (SISSOEFF et al., 2005).

A porção extracelular da glicoproteína G é responsável por ligar em receptores celulares, fato muito importante para a patogenicidade viral, uma vez que ao se ligar aos receptores neurais de neurotropina (p75NTR), receptor nicotínico de acetilcolina ou receptor de molécula de adesão de célula neural, desencadeia a endocitose viral (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). Por esse motivo é caracterizada como o principal antígeno viral responsável pela indução da resposta imune contra a infecção viral, por induzir a formação de anticorpos neutralizantes contra epítomos específicos lineares e conformacionais, além de estimular a atividade citotóxica de células T citotóxicas e T *helper* (ITO; MOSELEY; SUGIYAMA, 2016; SINGH et al., 2017).

2.2. VACINAS ANTIRRÁBICAS

Vacinas antirrábicas veterinárias e humanas são um importante fator no combate e proteção à doença. Essas devem atender a alguns padrões de qualidade, recomendados pela OMS, principalmente a potência mínima de 2,5 unidades internacionais (UI)/dose, determinado por teste de potência de proteção em camundongos. A administração deve ser, preferencialmente, via intramuscular, sendo também aceitável a via intradérmica que necessita de menor volume por dose, reduzindo o custo total das profilaxias pós-exposição sem prejudicar a segurança ou imunogenicidade do protocolo (WHO, 2013a). No presente momento, as vacinas disponíveis já aprovadas para uso e em desenvolvimento são classificadas em 4 grupos: vacinas inativadas de tecido nervoso, vacinas inativadas de cultivo celular, vacinas de vírus vivo atenuado e vacinas recombinantes (ZHU; GUO, 2016).

As cepas virais utilizadas na produção de vacinas antirrábicas variam conforme o produtor, podendo ser o *Challenge Virus Standard* (CVS), *Flury LEP*, *Street Alabama Dufferin* (SAD), *Pasteur Virus* (PV), *Pitmann Moore* (PM) entre outras. Vale ressaltar que as vacinas disponíveis atualmente têm como base o RABV fenótipo 1 e genótipo 1, por ser o mais comum causador da raiva em todo o mundo. Por esse motivo, as vacinas podem não proteger contra as outras espécies do gênero (WHO, 2013a).

Para uso humano são utilizadas apenas vacinas inativadas, produzidas inicialmente por Pasteur e seus colaboradores a partir de tecido nervoso, e aperfeiçoada por Fermi, Semple e outros utilizando o fenol como inativante viral (JACKSON, 2013). O protocolo de vacinação era extenso e vários casos de paralisia, devido à presença de mielina, foram reportados, assim como casos de raiva iatrogênica em decorrência de efeitos e complicações de tratamentos médicos, e de raiva pela inativação incompleta de vacinas (PARÁ, 1965; TARANTOLA; CYRILLE; BRIGGS, 2018). Com o intuito de solucionar este problema, Fuenzalida e colaboradores desenvolveram uma vacina produzida em cérebro de camundongos neonatos, que continha uma quantidade inferior de mielina e, desta forma, menor capacidade de causar efeitos adversos graves. Esta vacina ainda é utilizada em alguns países em desenvolvimento, entretanto desde 1984 a OMS recomenda a descontinuidade da produção de vacinas provenientes de tecido nervoso e sim o emprego de vacinas antirrábicas produzidas em cultivo de células *in vitro* (BRIEN; NOLAN; WG, 2018).

Atualmente dois processos de produção *in vitro* são empregados por produtores em todo o mundo: produção de vacina antirrábica em ovos embrionados de galinha e em linhagens celulares adaptadas para esse fim. Ambas são altamente purificadas e possuem efetividade equivalente, portanto podem ser utilizadas para os mesmos regimes de PPE recomendado pela OMS (TARANTOLA; CYRILLE; BRIGGS, 2018). Como exemplo, pode-se citar a vacina produzida em células humanas diploides (Imovax[®] *Rabies Vaccine*, Sanofi Pasteur), considerada a vacina de referência; em células de rim de macaco (Verorab[®], Sanofi Pasteur); em cultura primária de fibroblastos de galinha (RabAvert[®], Novartis Vaccines and Diagnostics); e em embriões de galinha (Rabipur[®], GlaxoSmithKline). Essas são as vacinas utilizadas nos protocolos de profilaxia pré e pós-exposição, comprovadas por serem seguras e eficazes na prevenção da raiva (JACKSON, 2013).

Para animais domésticos existem várias vacinas disponíveis, produzidas também por cultivo celular (Nobivac Rabies[®], MSD Animal Health; Rabisin[®], Merial; Rhabdocell[®], TECPAR). O que as difere são os processos de purificação, que são relativamente menos exigentes para as vacinas animais do que para as humanas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014a).

Já as vacinas específicas para animais silvestres, em forma de iscas, utilizam a via de administração oral contendo vírus vivo atenuado, sendo altamente imunogênicas (DIETZSCHOLD et al., 2003).

Com o intuito de reduzir o custo da produção e consequentemente dos protocolos de PPrE e PPE, novas vacinas antirrábicas utilizando-se da engenharia genética estão sendo desenvolvidas, com os principais objetivos de obtenção de vacinas mais imunogênicas, sem risco de infecção por vírus residual, em dose única, sem necessidade de armazenamento em cadeia fria, administradas preferencialmente por via oral e mais baratas (FOOKS; BANYARD; ERTL, 2018). Para tanto, várias vertentes de pesquisas estão sendo conduzidas pelos produtores mundiais.

O principal antígeno viral do RABV, a glicoproteína G (RV-G), responsável pela indução de produção de anticorpos neutralizantes, é alvo de inúmeros esforços para desenvolver vacinas de proteína recombinante produzidas em cultura celular (RVGP) (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017; DIETZSCHOLD et al., 2003). Para que seja realmente imunogênica, a proteína G produzida artificialmente deve possuir as mesmas características estruturais presentes nas partículas virais, principalmente sua forma trimérica responsável pela ligação no receptor celular neuronal necessária para infecção e indução de resposta imune (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). Até o momento vários sistemas de expressão utilizando linhagens celulares diversas foram estudados com resultados promissores, porém ainda são menos eficazes e sem imunogenicidade suficiente para regimes de dose única (DIETZSCHOLD et al., 2003; FOOKS; BANYARD; ERTL, 2018).

Vacinas genéticas, utilizando vetores plasmidiais de DNA ou RNA ou vetores virais contendo o gene da RV-G, também estão sob estudo. Estas têm a vantagem de serem relativamente fáceis de construir, manipular e produzir (DIETZSCHOLD et al., 2003). Os vetores são captados pelas células do organismo com diferenças significativas entre eles, induzem a expressão *in situ* de proteína G já com as modificações pós-transcricionais e por fim geram anticorpos neutralizantes de alta

afinidade. Apesar de resultados interessantes com camundongos, cães e primatas não humanos, a necessidade de altas doses de vetores para grandes animais e a baixa imunogenicidade de vacinas com DNA ainda é um empecilho para sua utilização (DIETZSCHOLD et al., 2003; ULLAS; DESAI; MADHUSUDANA, 2012).

Vacinas antirrábicas de vírus vivo atenuado contendo o vírus vaccínia expressando a RV-G já são utilizadas a décadas para a imunização oral de animais silvestres nos Estados Unidos, sendo responsável por grandes avanços no controle da doença no país. Entretanto acidentes com profissionais envolvidos com as campanhas de vacinação levantam a necessidade de desenvolvimento de vacinas mais seguras e imunogênicas, com muitos vetores virais já em estudo. Entre eles, vetores de adenovírus expressando a RV-G têm-se mostrados mais promissores, pois são altamente imunogênicos em animais adultos e neonatos, apresentando grande potencial para vacinas orais para animais silvestres, sendo também estudados como alternativas para vacinas humanas. Vacinas com cepas de vírus rábico atenuadas (SADB19, SAB-1 e 2) também já estão em uso na Europa para o controle de raiva em raposas, entretanto não funcionam bem em outras espécies de animais (DIETZSCHOLD et al., 2003). Estudos com outras cepas de RABV atenuados, como SRV9, mostraram resultados promissores em camundongos e podem ser considerados como alternativas para vacinação de cães, animais de pecuária e silvestres (HUANG et al., 2015).

Em 2015 várias organizações mundiais, como a OMS, a Organização Mundial para Saúde Animal (OIE), a Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Aliança Global para Controle da Raiva (GARC), se uniram para lutar contra a raiva humana e elaboraram um plano estratégico para eliminar as mortes decorrentes dessa doença até 2030, chamado *Zero by 30*. Uma das estratégias do plano é a disponibilização de vacinas humanas que atendam a todos que necessitarem de PPE e vacinas veterinárias para a imunização de animais domésticos (WHO, 2018).

Em estudo feito por Ives e colaboradores, estimou-se que a capacidade de produção mundial de vacinas antirrábicas em 2017 era de 90 e 181 milhões de doses de vacinas humanas e veterinárias, respectivamente (IVES; DIEUZY-LABAYE; ABELA-RIDDER, 2018). Segundo a OMS, uma cobertura vacinal de 70% da população canina é suficiente para o controle da transmissão de raiva por esta via, porém Rupprecht e colaboradores estimaram que menos de 20% dos cães

presentes em países endêmicos são vacinados atualmente (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017). A fim de atingir o objetivo traçado para 2030, calcula-se que serão necessárias cerca de 2 bilhões de doses de vacina antirrábica canina para países da África, Ásia e Oriente Médio, número que excede significativamente a capacidade de produção de produtores mundiais (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

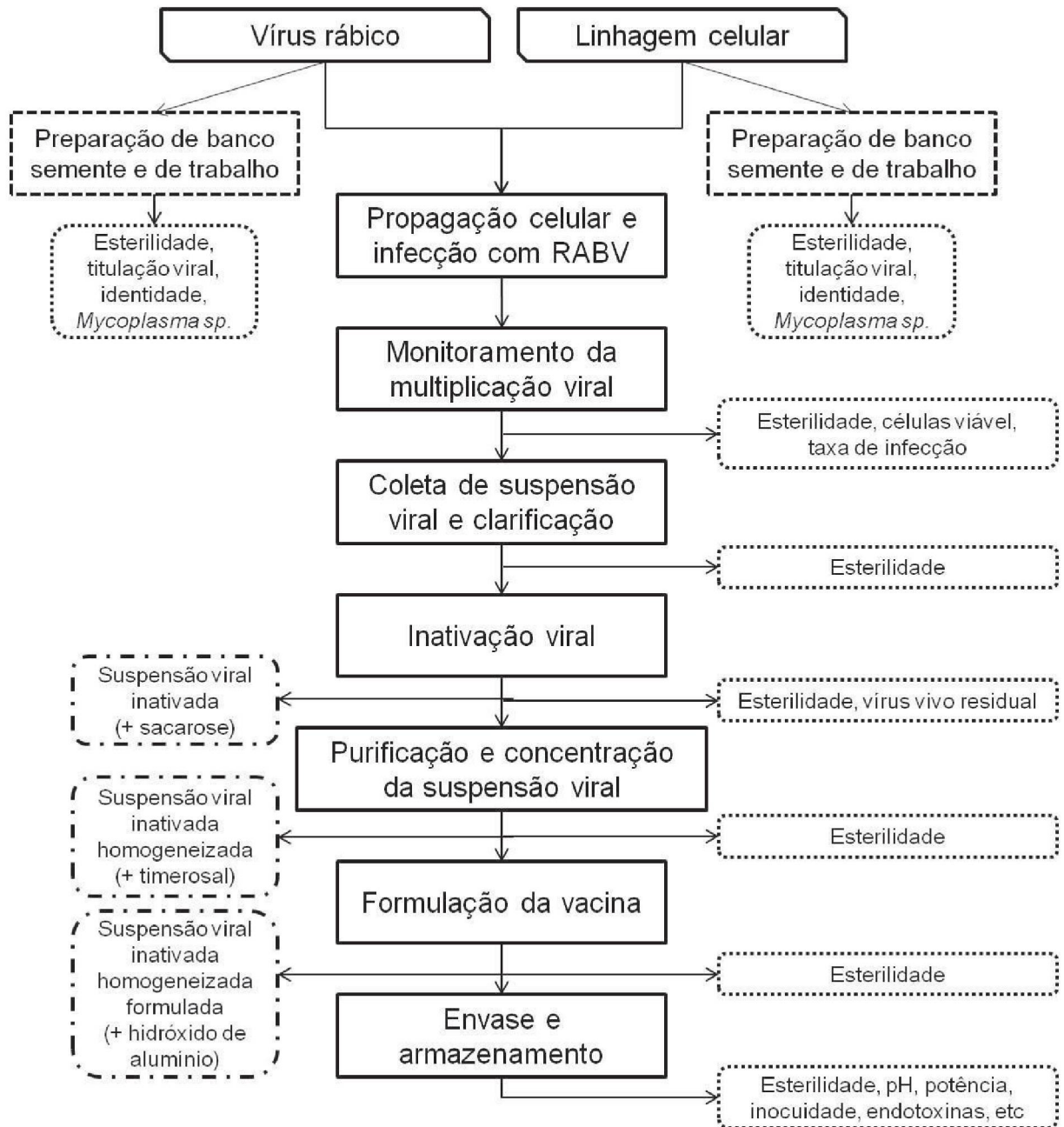
Para o êxito do plano global de eliminação de raiva humana até 2030, organizações internacionais juntamente com governos devem investir no desenvolvimento e produção de vacinas mais seguras, eficazes e acessíveis assim como garantir a qualidade da produção destes itens (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; WHO, 2018)

2.2.1. Produção de vacina antirrábica inativada em cultivo celular

A vacina antirrábica clássica com vírus inteiro inativado deve conservar as mesmas características que o vírus selvagem, porém sem a capacidade de causar a doença (WHO, 2013a). A imunização com vacinas deste tipo garante a indução de anticorpos neutralizantes direcionados contra a glicoproteína presente na parte externa da partícula viral, ativação de células T *helper* e citotóxicas e proteção contra inoculações de vírus selvagem (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017).

As várias vacinas disponíveis no mercado são produzidas com diferentes cepas virais e linhagens celulares, porém o fluxo de produção é essencialmente o mesmo, composto por inúmeras etapas complexas (Figura 3), e devem essencialmente seguir as especificações delineadas pela OMS (WHO, 2007). Inicialmente são escolhidas a cepa viral e linhagem celular adequadas para serem utilizadas para o cultivo e preparados os bancos “sementes” celular e viral e de trabalho para inoculação nos biorreatores. A linhagem celular de rim de hamster neonato (*Baby Hamster Kidney*, BHK-21) é uma das mais utilizadas para este fim, assim como células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano. Já as cepas virais mais comuns são a PV, PM e Flury LEP (KALLEL et al., 2003; RECULARD, 1996). A produção de vacinas antirrábicas deve ser realizada em planta específica, sem a manipulação de outras cepas ou linhagens celulares para evitar contaminação cruzada das mesmas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b).

FIGURA 3: FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VACINA ANTIRRÁBICA INATIVADA.



FONTE: O autor (2019).

Definidas as linhagens, a propagação do vírus pode ser feita em sistemas estáticos, em garrafas de cultivo celular, ou suspensão em garrafas *roller* ou biorreatores, sendo este último o mais empregado. O cultivo celular em biorreatores possibilita o monitoramento contínuo de importantes fatores de crescimento celular, físico-químicos e de infecção viral, proporcionando altos rendimentos com segurança e reprodutibilidade. As partículas virais são então coletadas, adicionam-se

estabilizantes, são submetidas ao processo de clarificação para a retirada de *debris* celulares e inativadas (Suspensão viral inativada). A próxima etapa é a concentração e purificação da suspensão viral, que pode ser realizada por diversos processos, como por exemplo centrifugação em gradiente de sacarose, filtração tangencial ou cromatografias de troca iônica. Por fim, a vacina é formulada com a adição de conservantes (Suspensão viral inativada homogeneizada), adjuvantes (Suspensão viral inativada homogeneizada formulada) e diluentes dependendo do caso, seguido do envase, podendo ou não passar por processo de liofilização, e armazenada até a liberação do produto finalizado (RECULARD, 1996; RUPPRECHT; NAGARAJAN, 2015). Os processos de produção podem sofrer alterações entre os produtores e também de acordo com o público final, ou seja, se a vacina produzida é para uso humano ou animal.

2.2.2. Inativação viral

A inativação do vírus rábico pode ser feita utilizando agentes físicos como a luz ultravioleta ou radiação gama, ou químicos, como a beta-propiolactona (BPL) e acetiletilaminas, dentre outros (JACKSON, 2013; RECULARD, 1996).

A inativação viral pela BPL é a mais comum, por ser um agente alquilante amplamente usado na inativação de vacinas virais (PAWAR et al., 2015; PERRIN; MORGEAUX, 1995; SASAKI et al., 2016). O uso deste agente é bastante indicado por ser uma substância química que não necessita de neutralizante para interromper a reação, é hidrolisada completamente dentro de três horas a 37°C e mais rapidamente na presença de *debris* celulares ou meio de cultura, e ainda não apresenta produtos de degradação tóxicos. A OMS recomenda que a concentração utilizada de BPL não ultrapasse 0,1%, e vários estudos utilizam concentrações ainda menores com resultados satisfatórios de inativação viral (SASAKI et al., 2016). A inativação do vírus se dá pela alteração da estrutura do RNA impedindo seu uso como molde para replicação, uma vez que a BPL danifica os resíduos de purinas, principalmente a guanina, resultando na sua leitura errada pela polimerase. Ocorre também a ligação cruzada de guaninas alteradas das fitas de RNA, formando ligações intra e inter-fitas, prejudicando também a replicação do RNA viral (PERRIN; MORGEAUX, 1995).

Entretanto a BPL apresenta algumas desvantagens, como o alto custo, necessidade de armazenamento em freezer -20°C e a característica de ser um produto carcinogênico potente com riscos ocupacionais, além de potencialmente causar efeitos indesejáveis nas proteínas de membrana de certos vírus, podendo alterar a imunogenicidade de algumas vacinas (ABD-ELGHAFAR et al., 2016; BONNAFOUS et al., 2014; PUSHKO et al., 2018). Por esse motivo outros agentes inativantes estão sendo estudados.

O composto químico etilenimina é utilizado a décadas para a inativação de vacinas virais, com resultados positivos também para a inativação de vacina antirrábica com a vantagem de que este agente pode ser armazenado em temperatura ambiente, enquanto que a BPL deve ser mantida a -20°C (LARGHI et al., 1976; MONDAL et al., 2005; SARKAR et al., 2017).

Estudos utilizando o peróxido de hidrogênio, um agente altamente oxidante, mostraram seu potencial para a inativação de RABV na produção de vacina antirrábica, assim como outras vacinas virais, sendo um agente inativante seguro, eficiente e sem causar danos à imunogenicidade das vacinas analisadas (ABD-ELGHAFAR et al., 2016; DEMBINSKI et al., 2014; QUINTEL et al., 2018).

A radiação ultravioleta, um agente físico para a inativação viral, era utilizada nas primeiras vacinas antirrábicas produzidas em tecido nervoso, porém este método foi substituído diante da sua dificuldade de execução (JACKSON, 2013). Atualmente, estudos realizados com radiação gama apresentam bons resultados na inativação de espécies virais, no entanto, ainda são inferiores aos obtidos utilizando a BPL como agente inativante, podendo apresentar alterações de proteínas importantes para a imunogenicidade das vacinas (ASTILL et al., 2018; DAVID et al., 2017; SHAHRUDIN et al., 2018).

2.2.3. Controle de qualidade

O processo de produção de vacinas antirrábicas inativadas demanda diversos passos de controle de qualidade, que podem ser divididos em controles do processo e controles do produto final (Figura 3).

O primeiro ponto de controle da produção de uma vacina antirrábica inativada é a confirmação da qualidade da cepa viral e linhagem celular escolhidas para a produção, submetendo-as a ensaios de conferência de identidade e contaminação

microbiana, principalmente *Mycoplasma sp.* Após essa análise, os bancos sementes virais e celulares e de trabalho preparados também devem ser verificados quanto esterilidade, título viral e viabilidade celular, respectivamente (RECLARD, 1996; RUPPRECHT; NAGARAJAN, 2015).

Os controles de qualidade realizados durante a produção das vacinas antirrábicas inativadas dependem do processo de produção empregado. Durante a propagação viral em biorreator utilizando células em suspensão, controles físico-químicos devem ser abordados diariamente, como temperatura de cultivo, pressão no interior do biorreator, agitação das hélices, potencial hidrogeniônico (pH) e pressão parcial de oxigênio (pO_2), entre outros específicos de cada método de produção. Controles biológicos como concentração e viabilidade celular, assim como intensidade de infecção das células e titulação viral da suspensão também devem ser realizados durante todo o período de produção, bem como verificação da esterilidade do produto intermediário. O ensaio de vírus vivo residual do produto intermediário também é realizado nesta etapa. (JACKSON, 2013; RUPPRECHT; NAGARAJAN, 2015).

Outro ponto crítico no processo de produção de vacinas é o controle das soluções utilizadas, como meio de cultura, soluções tampão para controle de pH, inativantes, estabilizantes, conservantes e adjuvantes, que devem passar por testes de esterilidade sem esquecer do controle de qualidade das matérias-primas, como identificação do insumo, teor e doseamento de contaminantes (USP, 2019).

Após a produção do produto final, diversos ensaios devem ser realizados antes da sua liberação para a comercialização. Estes requisitos variam conforme as agências regulatórias e a finalidade da vacina, se para uso animal ou humano, neste geralmente são mais rígidos (ANVISA, 2010; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b).

Os principais ensaios para controle de qualidade de vacinas para uso humano descritos nas farmacopéias internacionais, e exigidos pelas agências regulatórias, são (Tabela 1): esterilidade (bacteriana e fúngica), estabilidade, concentração de adjuvantes, efetividade do agente antimicrobiano, potência, pureza, endotoxinas bacterianas, umidade residual para vacinas liofilizadas, pirogênios, materiais constituintes, vírus residual infeccioso, DNA celular residual, concentração de glicoproteína rábica, pH e concentração de albumina de soro bovino. Seus limites

variam conforme o processo de produção utilizado e a agência regulatória (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b; USP, 2019).

Para vacinas veterinárias, os principais ensaios exigidos são: esterilidade (bacteriana e fúngica), inocuidade, potência, vírus vivo residual, identificação de anticorpos antirrábicos e controle de pH. Da mesma forma os limites aceitos para os ensaios acima são determinados dependendo do processo de produção e da agência regulatória do local da produção (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014a; MAPA, 1988).

Vários ensaios exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) necessários para a liberação final da vacina antirrábica inativada veterinária são realizados em animais de laboratório, são eles os ensaios de potência, segurança e vírus vivo residual, constantes na Portaria nº 228 do MAPA. O ensaio de vírus vivo residual visa garantir a inativação viral de vacinas produzidas por essa técnica e consiste da inoculação intracerebral da vacina pura e diluída em camundongos neonatos e adultos, conforme a técnica específica, e observação por 21 dias, período em que os camundongos devem permanecer normais, sem apresentarem sinais e sintomas clássicos de raiva, como pelo erigido, paralisia de membros inferiores, entre outros. O ensaio utiliza 16 camundongos neonatos e 40 adultos da linhagem *Swiss-Webster* por lote de vacina testada (MAPA, 1988).

TABELA 1: PRINCIPAIS ENSAIOS EXIGIDOS PARA O CONTROLES DE QUALIDADE DE VACINAS ANTIRRÁBICAS.

VACINAS HUMANAS				
Controle de Qualidade	Especificação	Produto em Processo	Produto Final	Referência
Vírus residual infeccioso	Sem replicação viral	X		FarmEur 2014
DNA celular residual	Max 10 ng/dose	X		FarmEur 2014, USP 2019
Concentração de glicoproteína	Dentro do limite do produto específico		X	FarmEur 2014
Esterilidade	Satisfatório		X	FarmEur 2014 USP 2019
Concentração de albumina bovina	Max 50 ng/dose		X	FarmEur 2014
Endotoxinas bacterianas	Menos de 25 UI/dose		X	FarmEur 2014
Pirógenos	Satisfatório		X	FarmEur 2014
Umidade residual	Max 3%		X	FarmEur 2014
Potência	Maior ou igual a 2,5 UI/dose		X	FarmEur 2014 USP 2019
VACINAS VETERINÁRIAS				
Controle de Qualidade	Especificação	Produto em Processo	Produto Final	Referência
Vírus vivo residual	Sem replicação viral	X	X	FarmEur 2014 MAPA 1988
Concentração de antígeno na coleta	Dentro do limite do produto específico	X		FarmEur 2014
Potência	Titulação de anticorpos maior do que com vacina de referência	X		FarmEur 2014
Identificação	Produção de anticorpos antirrâbicos nos animais		X	FarmEur 2014
Esterilidade bacteriana e fúngica	Satisfatório		X	FarmEur 2014 MAPA 1988
Potência	Maior ou igual a 1 UI/dose		X	FarmEur 2014 MAPA 1988
Inocuidade	Animais normais		X	MAPA 1988
pH	6,8 a 8,5		X	MAPA 1988

FONTE: O autor (2019).

2.3. MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA CONTROLE DE QUALIDADE

Entidades regulatórias mundiais que controlam os padrões de qualidade de produtos farmacêuticos, entre eles vacinas humanas e veterinárias, com publicações de guias pelas OMS, Organização mundial de Saúde Animal (OIE), Farmacopeia Europeia (FarEu), entre outras, estimulam o desenvolvimento de procedimentos alternativos para cada vez mais reduzir a utilização de animais na pesquisa e produção de biológicos e medicamentos. Este pensamento está em consonância com o Princípio dos Três Rs (3Rs): *replacement*, *reduction*, *refinement*, ou substituição, redução e refinamento, empregado em várias áreas da indústria, meio ambiente e em especial na utilização de animais de laboratório (HILL, 2011).

A principal maneira de se reduzir o uso de animais em ensaios laboratoriais é a alteração de testes *in vivo* para ensaios *in vitro*, sempre que possível. A avaliação *in vivo* de certos produtos ainda é importante, mas o desenvolvimento de ensaios *in vitro* está sendo encorajado extensivamente pelas organizações de saúde mundiais (BRUCKNER et al., 2003). Entretanto os novos métodos alternativos devem seguir especificações regulatórias para que sejam considerados seguros e eficientes para a avaliação de qualidade dos produtos biológicos a que se referem (SHIN et al., 2011; WOODLAND, 2011).

Para que um novo método seja aceito como alternativo a um método já consagrado, este deve ser validado pelas agências responsáveis por esse fim, denominadas Centros para Validação de Métodos Alternativos, como o ECVAN (*European Center for the Validation of Alternative Methods*) ou o BRACVAM (*Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods*). Após avaliação por essas agências, são realizados estudos interlaboratoriais para a validação propriamente dita do novo método desenvolvido. No Brasil, este estudo é conduzido pelo BRACVAM através dos laboratórios ligados ao RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos) e INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). Após este processo, o BRACVAM propõem ou não o novo método às agências regulatórias nacionais para incorporação nas legislações ou guias pertinentes. Os métodos alternativos somente são aceitos quando claramente demonstrado que oferecem controles satisfatórios sobre os itens analisados (BRUCKNER et al., 2003).

2.3.1. Isolamento viral em cultivo celular

O cultivo de células teve seu início em 1907 com Harrison e em 1912 com Carrel, que desenvolveram técnicas para estudar em meio ambiente controlado o comportamento e mecanismos de células animais fora de seu organismo de origem. As técnicas iniciais foram cada vez mais aperfeiçoadas e são utilizadas para diversos propósitos, como pesquisas científicas básicas, produção de imunobiológicos, incluindo vacinas, controle de qualidade de produtos químicos e medicamentos, terapia celular, entre outros (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

As células cultivadas são classificadas de acordo com sua origem em células primárias, oriundas de um fragmento de tecido que mantém suas características originais, porém sobrevivem por curtos períodos de tempo em cultura; células de linhagens contínuas, que ainda apresentam características genéticas e fenotípicas originais, mas possuem alta capacidade de proliferação; e por fim linhagens celulares transformadas, com uma ou mais mutações, que conferem capacidade de proliferação contínua. Células em cultivo também podem ser divididas em linhagens aderentes, que necessitam de adesão à uma superfície de contato para a proliferação, e não aderentes, passíveis de multiplicação em suspensão (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

O vírus rábico, isolado em cultivo celular pela primeira vez em 1936, é capaz de se multiplicar em várias linhagens celulares, principalmente neuroblastoma 2A (N2A), células BHK-21, células VERO e células de embrião de galinha (CER) (WHO, 2019). O cultivo do RABV em linhagens de origem neural é preferível, entretanto células BHK-21 são comumente utilizadas na pesquisa, assim como em ensaios de controle de qualidade de produção de vacinas antirrábicas e diagnóstico, devido à vantagens no seu cultivo e alta sensibilidade ao vírus rábico (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b, 2014a; KRÄMER et al., 2009; TAKAYAMA-ITO et al., 2014; WHO, 2007, 2019).

2.3.2. Métodos moleculares para quantificação viral

A técnica inovadora de biologia molecular para detecção de material genético, reação em cadeia da polimerase (PCR), descrita na década de 90, revolucionou, entre outros aspectos, os métodos de diagnóstico de várias doenças, por ser capaz

de detectar baixíssimas concentrações de sequências alvo de DNA, bem como RNA, de agentes infecciosos (RUPPRECHT; NAGARAJAN, 2015). Esta técnica consiste da identificação de sequências alvo no material genético sob análise por oligonucleotídeos específicos, também chamados de *primers*, que nada mais são do que sequências de nucleotídeos complementares ao alvo a ser identificado. Por mudanças de temperatura, os *primers* se ligam às sequências alvo e a enzima polimerase realiza a multiplicação desta sequência inúmeras vezes até que seja possível a sua visualização através de eletroforese em gel de agarose, que realiza a separação dos fragmentos de DNA produzidos (RAYMAEKERS et al., 2009).

Com a elaboração de novos sistemas de detecção utilizando corantes intercalantes de DNA e sondas fluorescentes, foi desenvolvida uma nova metodologia, chamada de PCR em tempo real (qPCR), capaz de quantificar o material genético presente na amostra de maneira rápida, simples, sensível e específica. No PCR em tempo real a quantificação da sequência alvo que está sendo multiplicada pela polimerase é feita pela detecção do sinal fluorescente proveniente das sondas ou corantes utilizados (BUSTIN et al., 2009; KUBISTA et al., 2006; RAYMAEKERS et al., 2009).

Para o desenvolvimento de novos métodos de quantificação para diagnóstico ou pesquisa utilizando a técnica de qPCR, pontos importantes como padronização, validação e controle de qualidade do método devem ser respeitados para que as técnicas sejam reproduzíveis. A padronização consiste na determinação de algumas características do ensaio, a fim de garantir a robustez do mesmo, como por exemplo, limites de detecção e de quantificação, especificidade, exatidão e precisão inter e intra-ensaio. A padronização da coleta e preparo da amostra a ser analisada também é de suma importância para o bom funcionamento do método, bem como o desenho dos oligonucleotídeos a serem utilizados para a amplificação e quantificação do material genético em questão. Outros pontos importantes são a robustez e aplicabilidade do método, a utilização de controles positivo e negativo e procedimentos para análise de dados validados (BUSTIN et al., 2009).

Vários métodos utilizando o PCR em tempo real combinado a uma reação de transcrição reversa (RT-qPCR) para a quantificação do vírus causador da raiva já foram desenvolvidos podendo ser utilizados como métodos auxiliares para uso no diagnóstico da raiva humana e na vigilância epidemiológica de animais (DACHEUX et al., 2008, 2016; FAYE et al., 2017; SCHLOTTAU et al., 2017; WADHWA et al.,

2017), porém o ensaio de identificação do antígeno rábico por Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD), internacionalmente conhecido como *Fluorescent Antibody Test* (FAT), ainda é considerado o método de diagnóstico padrão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011b; OIE, 2013).

2.3.3. Aplicação dos 3Rs no controle de qualidade de vacinas antirrábicas

Produtores internacionais relatam o uso aproximado de até 70 mil camundongos por ano para o controle de qualidade de vacinas antirrábicas. Várias sugestões de redução ou refinamento no uso de animais já foram descritas, dentre elas a redução de número de animais por dose ou número de doses testadas, uso de anestésicos quando a via intracerebral é necessária, treinamento extensivo de técnicos e definição de limites de ensaios humanitários para reduzir sofrimento dos animais no momento da inoculação e durante o período de avaliação (BRUCKNER et al., 2003).

Porém, o objetivo maior dos 3Rs é a completa substituição dos animais em testes laboratoriais, já tendo vários ensaios desenvolvidos como alternativas para testes *in vivo*, como ensaios sorológicos para identificação de anticorpos neutralizantes como os ensaios de RFFIT (teste rápido de inibição de foco fluorescente) e FAVN (teste de vírus-neutralização com anticorpo fluorescente), ensaios para quantificação antigênica da glicoproteína rábica pelo método de ELISA, teste de pirogênios, entre outras (BRUCKNER et al., 2003; HORIUCHI et al., 2011). Os principais alvos de desenvolvimentos de novos métodos são os ensaios de potência e de segurança, exigidos para a liberação de lotes de vacinas antirrábicas, uma vez que utilizam a maior quantidade de animais (CASEY et al., 2011; CLAASSEN, 2011; DRAAYER, 2011).

Com relação ao ensaio de vírus vivo residual, este foi recomendado pela OMS após a realização da 56ª reunião do Comitê Especializado em Padronização Biológica em 2005, o ensaio *in vitro* utilizando células Vero, BHK-21 ou neuroblastoma. Neste ensaio, pelo menos 25 doses de vacina antirrábica inativada devem ser incubadas com uma das linhagens acima por 21 dias e então analisadas por ensaio de imunofluorescência, ou o sobrenadante deve ser injetado por via intracerebral em camundongos e observados por 14 dias (WHO, 2005). Em 2014, a FarEu 8ª Edição passou a apresentar, para vacinas humanas e veterinárias sem

adição de adjuvantes, o método *in vitro* já recomendado pela OMS. Já para vacinas veterinárias com adjuvantes, devido à toxicidade celular destes compostos, o método *in vivo* constante na Portaria nº 228 do MAPA, descrito no item 2.2.3, é recomendado (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b, 2014a; MAPA, 1988).

Em 2014, um grupo de cientistas japoneses padronizou um ensaio *in vitro* para a detecção de vírus viável residual em vacinas antirrábicas inativadas, incubando a vacina em células N2A e visualizando a infecção viral por imunofluorescência direta. Este método produziu resultados confiáveis e comparáveis com o ensaio *in vivo* exigido para liberação dos lotes de vacina pelas autoridades japonesas, e mostrou ser até 5 vezes mais sensível que o método *in vivo*. O ensaio é similar ao já proposto pela FarEu, porém o tempo que decorre para a liberação do produto final é de apenas 6 dias, tornando o ensaio mais prático para a rotina de controle de qualidade desta vacina (TAKAYAMA-ITO et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

A prova de vírus vivo residual em camundongos adultos e lactantes é o método *in vivo* exigido para o controle de produção de vacinas antirrábicas conforme a Portaria 228 de 25 de outubro de 1988, que rege o controle da produção e comercialização de vacina antirrábica para uso veterinário no Brasil, portanto não pode ser substituída completamente. Porém, uma vez validado, o ensaio de vírus vivo residual *in vitro* pode ser implantado no controle interno da produção da vacina, estando a validação de métodos alternativos de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, através da Resolução Normativa nº 17 de 03 de julho de 2014, com o programa 3Rs: *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (reposição).

As principais vantagens da validação deste ensaio *in vitro* são a redução do uso de animais, do custo do ensaio e do tempo de liberação do lote no controle interno da produção.

Atualmente, cada lote final de vacina antirrábica inativada veterinária produzida pelo TEPCAR é composta por dois lotes de produto intermediário. Portanto, a cada lote produzido são realizados ensaios de vírus residual nos produtos intermediários para controle interno, bem como no lote envasado para o controle oficial, totalizando 3 ensaios por lote. Com a validação do ensaio *in vitro* é possível reduzir em 2/3 a quantidade de animais utilizados nesta etapa de controle da produção. Já a redução do tempo de realização do controle interno poderá agilizar a processo de produção da vacina uma vez que o produto intermediário poderá ser envasado cinco vezes mais rápido, garantindo a fluidez no processo.

4. OBJETIVO

4.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um método *in vitro* para a comprovação de inativação de vírus rábico em vacina antirrábica para uso em animais domésticos e compará-lo com o método *in vivo* já utilizado.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o ensaio de cultivo celular e recuperação viral;
- Avaliar a interferência de aditivos utilizados na formulação da vacina e grandes quantidades de partículas virais inativadas na replicação viral de vírus residuais contidos nas amostras através do ensaio de inativação viral *in vitro* com subcultura;
- Avaliar as diversas etapas de formulação da vacina para determinar qual amostra será utilizada para o ensaio de recuperação viral;
- Comparar a sensibilidade entre os ensaios de inativação viral *in vitro* e *in vivo*;
- Padronizar a técnica de quantificação viral por RT-qPCR do vírus rábico íntegro e inativado;
- Avaliar a inativação viral através do RT-qPCR padronizado;
- Avaliar a combinação das técnicas de cultivo viral e RT-qPCR para a padronização do ensaio de inativação viral *in vitro*.

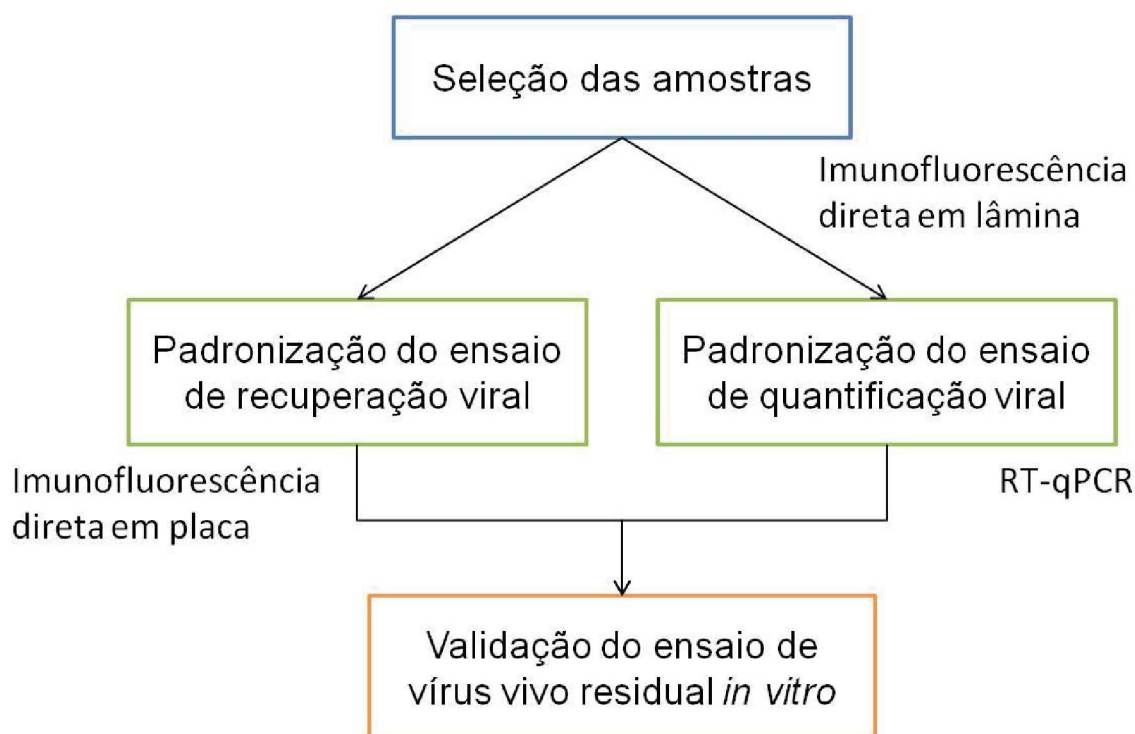
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental laboratorial, dividido em três etapas. A primeira etapa refere-se à seleção das amostras de vírus rábico de trabalho (VRT) de acordo com a produção de suspensão viral pelo Centro de Desenvolvimento e Produção de Imunobiológicos (CDI) do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), avaliando a presença de vírus pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) em lâmina. A segunda etapa constitui-se da padronização das técnicas de cultivo e quantificação viral por ensaio de RT-qPCR. A terceira etapa refere-se à validação inicial do ensaio de vírus vivo residual *in vitro* comparando-o com o método padrão *in vivo*, utilizando amostras de produtos intermediários do processo de produção da vacina antirrábica inativada veterinária, produzidos para este fim com os mesmos critérios exigidos para a produção da vacina Rhabdocell® (Figura 4).

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais do TECPAR, sob nº 08/17, e adendos nº 006/18 e 001/19 (ANEXO 1).

FIGURA 4: FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES: ETAPA 1 EM AZUL, ETAPA 2 EM VERDE E ETAPA 3 EM LARANJA.



FONTE: O autor (2019).

5.2. AMOSTRAS

O estudo foi realizado com amostras produzidas no CDI – TECPAR: suspensão viral (SV), suspensão viral inativada (SVI), suspensão viral inativada formulada (SVIF) e suspensão viral inativada formulada homogeneizada (SVIFH), conforme Figura 3. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em freezer de -80°C até o momento das análises.

5.3. CULTIVO CELULAR

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a BHK-21 adaptada para cultivo em monocamadas, cultivada em garrafas T75 com a mistura dos meios de cultivo Meio *Eagle* Modificado de *Dulbecco* (DMEM) e HAM F-12 suplementado com 0,055% de piruvato de sódio, 2,44% de bicarbonato de sódio, 1,5% de glicose e 5% de soro fetal bovino (SFB), chamado de Meio de Cultivo Padrão para Inóculo (MCPI) 5%, para a manutenção, e incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5%.

As células criopreservadas foram descongeladas e mantidas em cultura por no máximo 60 dias, repicadas a cada 2-3 dias da seguinte forma: o meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas com 2,5 mL de tampão fosfato-salina (PBS) aquecido para retirar todo o meio da garrafa. Foi adicionado 2,5 mL de Tripsina 0,1% aquecida a 37°C e a garrafa T75 foi incubada em estufa a 37°C por 2-3 minutos ou até que as células se soltassem. Foram adicionados então 5 mL de MCPI 5% e, com auxílio de uma pipeta sorológica, as células foram ressuspensas completamente. Foi coletada uma amostra de 0,5 mL para realizar a contagem em câmara de Neubauer e determinar a quantidade necessária para deixar uma concentração de $1,0 \times 10^5$ ϕ /cm² na garrafa T75. O volume foi ajustado para 50 mL de MCPI 5% e as células foram incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5%.

No dia do ensaio de recuperação viral, as células foram tripsinizadas conforme descrito acima, contadas e foi feita uma suspensão nas concentrações de estudo em MCPI suplementado com SFB em diferentes concentrações.

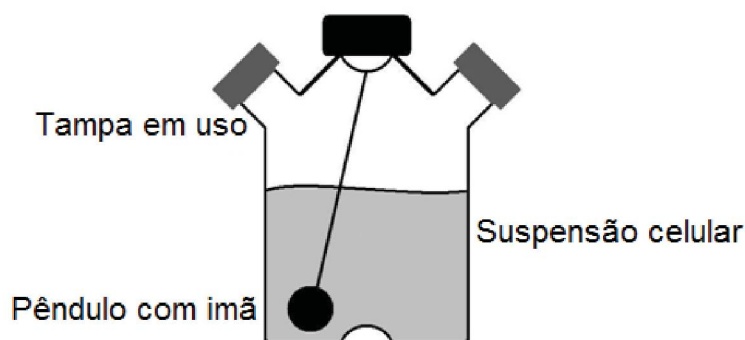
Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individuais adequados.

5.4. PRODUÇÃO DA SUSPENSÃO VIRAL INATIVADA EM BIORREATORES

Para a produção da suspensão viral também foi utilizada a linhagem celular BHK-21, porém adaptada para cultivo em suspensão. As células foram cultivadas em uma mistura de meios DMEM e HAM F-12 suplementado com 0,055% de piruvato de sódio, 2,44% de bicarbonato de sódio, 1,5% de glicose, 0,05% de sulfato de gentamicina e 3% de SFB, chamado de Meio de Cultivo Padrão para Biorreator (MCPB 3%) ou 1% de SFB (MCPB 1%). A produção da suspensão viral foi realizada pelo método de perfusão em biorreatores de 75 litros, marca *New MBR* (*Multiple Bioreactors and Sterile Plants AG*, Suíça), controlado automaticamente pelo software iCC (*PCS - Process Control Systems AG*, Suíça).

Primeiramente as células foram cultivadas em 8 *spinners* de 1,25 L em MCPB 3%, incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% e agitação constante de 55 rpm, até concentração média de $1,5 \times 10^6$ ϕ /mL (Figura 5). Após atingirem esta concentração, as células foram transferidas para o biorreator estéril, adicionado MCPB 3% até 25 L e incubadas a 36°C até estarem com uma concentração adequada para serem infectadas com o vírus rábico.

FIGURA 5: GARRAFA SPINNER PARA CULTIVO DE CÉLULAS BHK-21.



FONTE: O autor (2019).

No dia da infecção, foi adicionado primeiramente DEAE-Dextran na concentração final de 50 μ g/mL para facilitar a adsorção do vírus nas células a serem infectadas. O vírus rábico PV foi descongelado, adicionado às células em cultura no biorreator e incubado em MCPB 1% a 33°C por 24 horas. Após as primeiras 24 horas foi iniciada a coleta da suspensão viral pelo método de perfusão, que variou entre 25 e 75 L a cada 24 horas dependendo do resultado do ensaio de

IFD em lâmina, que determina a classe infectiva do vírus rábico produzido – quanto mais alta for a classe da IFD, maior o volume perfundido.

A suspensão viral coletada foi armazenada em câmara fria a 5°C e sacarose a 50% (p/v) suficiente para concentração final de 5% foi adicionada como estabilizante. A inativação do vírus foi realizada com adição de beta-propiolactona na concentração final de 1/4000 (v/v), deixada em agitação 50 rpm por 48 horas a 5°C.

Amostras de suspensão viral coletadas antes e após a inativação foram armazenadas em freezer de -80°C até o momento das análises.

5.5. PRODUÇÃO DE VÍRUS RÁBICO DE TRABALHO EM GARRAFA *SPINNER*

Para os ensaios de vírus vivo residual *in vivo* e *in vitro* foi necessária a preparação de um estoque do vírus rábico de trabalho (VRT) a partir do vírus PV de referência, realizado da seguinte maneira: foi preparado 1 *spinner* de 1,25 L com células BHK-21 em suspensão na concentração 1,5 a 2,0 x 10⁶ ϕ /mL em MCPI 3% SFB.

No dia da infecção o *spinner* foi deixado em repouso por no mínimo 90 minutos em câmara fria (2 a 8°C) até ocorrer a sedimentação das células, com o êmbolo na direção da tampa lateral de uso (conforme Figura 5). Após esse período o *spinner* foi colocado em estufa a 33°C para ambientação por no mínimo 30 minutos. Passado o tempo de sedimentação e ambientação, foi retirado o máximo do sobrenadante, vertendo-o em frasco descarte, cuidando para não descartar as células decantadas. O volume necessário de DEAE-Dextran foi calculado para uma concentração final de 50 μ g/mL que, com auxílio de pipeta descartável, foi adicionado à suspensão celular e a mistura foi homogeneizada.

O vírus rábico de referência, PV, utilizado, foi descongelado, adicionado 500 μ L à suspensão celular e homogeneizado com movimentos circulares. O *spinner* foi incubado em estufa a 33°C por 2 horas com agitação intermitente, 5 minutos ligado a 30 rpm e 20 minutos desligado, sem ingresso de CO₂. Após o período de incubação, foi adicionado MCPI 1% até completar 1 L e o *spinner* foi incubado novamente a 33°C com agitação de 55 rpm por 1 hora. Após esse tempo foi coletada uma amostra para realizar a contagem celular e o *spinner* retornou à estufa a 33°C com agitação de 55 rpm por até 4 dias.

Diariamente, quando necessário, o pH foi ajustado com solução de bicarbonato de sódio 7,5% para ficar entre 7,4 e 7,8 e foi realizada a sedimentação das células para descarte de 50% do sobrenadante, substituindo-o por MCPB 1% novo. Também foram coletadas amostras diárias para contagem celular e IFD em lâmina. Quando o resultado da IFD foi classe 4, a suspensão celular foi filtrada em filtro 0,22 μm para retirada das células e foi calculada a quantidade a ser acrescentada de solução de sacarose a 50% (p/v) para obter uma concentração final de 5%. Foram retiradas amostras para avaliar potência de infectividade e identidade viral, para titulação em placa e para prova de esterilidade bacteriana e fúngica. A suspensão viral foi congelada em freezer de -80°C em tubos de microcentrífuga com 100 μL cada.

Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individuais adequados.

5.6. DETECÇÃO VIRAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA EM LÂMINA

Após a coleta das amostras de suspensão viral, foi realizado o ensaio de IFD em lâmina para a detecção de partículas virais viáveis.

As células infectadas foram ressuspensas em PBS e sua concentração foi acertada para $2,0 \times 10^6$ ϕ/mL . Em um quadrado da área demarcada de $0,25 \text{ cm}^2$ em lâmina de microscopia identificada, 50 μL desta suspensão foram sedimentados em uma superfície reta, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, a lâmina foi deixada secar e a presença das células sedimentadas foi verificada em microscópio óptico para verificação se o tapete celular formado ficou homogêneo. As células foram então fixadas com 50 μL de acetona 80% em freezer de -20°C por 7 minutos e após esse período, o sobrenadante foi novamente retirado e a lâmina foi deixada secar. A diluição do anticorpo primário anti-nucleocapsídeo rábico conjugado com fluoróforo FITC (BioRad®) foi avaliada a partir a diluição 1:20, ou conforme a indicação do fornecedor. A solução de conjugado foi preparada em solução de azul de Evans 1:40.000 e adicionado 40 μL de forma a cobrir todo o sedimento de células e a lâmina foi incubada a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após esse tempo, o conjugado foi removido e o sedimento de células foi lavado com solução de PBS por

3 vezes. A lâmina foi então seca a temperatura ambiente para posterior montagem da lamínula e avaliação das células infectadas em microscópio de imunofluorescência invertido em um aumento de 100 vezes.

O resultado foi apresentado conforme a intensidade de imunofluorescência em cinco classes: classe 0: ausência de focos fluorescentes; classe 1: focos fluorescentes em menos de 25% do campo analisado; classe 2: focos fluorescentes em 50% do campo analisado; classe 3: focos fluorescentes em 75% do campo analisado; classe 4: focos fluorescentes mais de 75% do campo analisado. As amostras com resultado classe 1 ou maior foram incluídas neste estudo.

5.7. ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VIVO*

O ensaio de vírus vivo residual *in vivo* foi realizado de acordo com o preconizado pela Portaria nº 228/MAPA, de 31 de outubro de 1988, em camundongos convencionais, neonatos e adultos da linhagem *Swiss-Webster*. A análise em camundongos neonatos foi feita da seguinte maneira: duas caixas contendo 1 fêmea com 8 filhotes de 4 a 6 dias de idade cada foram separadas e identificadas conforme a amostra a ser analisada. A amostra foi diluída com PBS na proporção 1/10, adicionada em banho de gelo, agitada e inoculada 0,01 mL por via intracerebral nos camundongos neonatos, com auxílio de seringa tipo tuberculina. Para a análise em camundongos adultos, foram separadas 4 caixas com 10 camundongos de 21 dias (11 – 14 g cada), que foram utilizadas da seguinte forma: 2 caixas com 10 camundongos para inoculação da vacina pura e 2 caixas com 10 camundongos para inoculação da vacina previamente diluída com PBS na proporção 10^{-1} . As amostras pura e diluída foram deixadas em banho de gelo, agitadas e inoculadas 0,03 mL por via intracerebral, com auxílio de seringa tipo tuberculina, em cada camundongo adulto.

Os camundongos neonatos e adultos foram avaliados diariamente por um período de 21 dias. A amostra foi considerada satisfatória quando:

- a) Nenhum animal apresentou sintomas específicos de raiva (pelo erigido, isolamento, movimentos lentos, tremores, convulsões, paralisia) durante o período de 21 dias de observação;
- b) O animal morto ou com sintomas específicos de raiva enviado para diagnóstico laboratorial (TIFD) apresentou resultado negativo para raiva.

A amostra foi considerada insatisfatória quando:

- a) Durante o período de observação, algum animal apresentou sintoma específico que culmine na morte por raiva, sendo que o mesmo foi confirmado pelo diagnóstico de TIFD com resultado positivo para presença de vírus rábico;
- b) Ocorrendo o resultado positivo da TIFD, foi realizado um novo ensaio de inativação viral a partir da suspensão de 10% a 20% do macerado cerebral do animal que apresentou o resultado positivo. Em caso positivo para TIFD o produto foi reprovado (este procedimento é realizado em centro especializado).

Observação: Somente foi realizado o reteste do produto quando uma amostra após inoculada, causou a morte, durante o período de observação dos animais, de um quantitativo superior a 4 (quatro) em 10 (dez) dos camundongos adultos e dos camundongos neonatos inoculados, e os mortos, após examinados, resultaram negativos para raiva no TIFD. Quando o exame de TIFD foi impossível de realizar, procedeu-se uma nova inoculação da amostra em um lote com o dobro de animais inicialmente inoculados e foi anotado no formulário de leitura do ensaio “RETESTE”. No entanto, quando houve mortalidade por causas inespecíficas ou animais mortos que não tiverem condições de serem enviados para TIFD (ex: canibalismo) foram realizados 2 retestes. O produto foi considerado satisfatório com 2 retestes aprovados.

Os animais utilizados para a realização dos ensaios *in vivo* foram provenientes do Centro de Experimentação Biológica – TECPAR em Araucária-PR.

5.8. ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL *IN VITRO*

O ensaio de recuperação viral *in vitro* foi realizado utilizando o método de IFD em placa da seguinte maneira: 50 µL de uma concentração a ser definida de células BHK-21 foram semeadas em placa de 96 poços, adicionados 150 µL de meio MCPI com diferentes concentrações de SFB e incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 24 horas para possibilitar sua adesão ao fundo da placa. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado, foram adicionados 200 µL das amostras de suspensão viral a serem analisadas diluídas em meio MCPI com as mesmas concentrações de SFB e a placa foi incubada novamente a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 2 horas. O meio então foi trocado por MCPI novo e as

placas foram incubadas por tempos determinados. O meio de cultura foi então removido e a placa foi deixada secar por 10 minutos. Uma vez seca, a placa foi fixada com acetona 80% por 20 minutos em banho de gelo. Após a fixação, o volume necessário de anticorpo anti-nucleocapsídeo rábico conjugado ao FITC (BioRad®) foi calculado conforme a diluição adequada para colocar 40 µL de conjugado em cada poço. A solução de conjugado foi preparada em solução de azul de Evans 1:40.000 e colocado de forma a cobrir todo o sedimento celular e a placa foi incubada a 37°C por 40 minutos. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi então realizada a avaliação das células infectadas em microscópio de imunofluorescência invertido num aumento de 100 vezes. O cálculo da titulação viral foi realizado pelo método de *Reed-Münch* e foi dado em dose infectiva de 50% do cultivo celular/mL (TCID₅₀/mL).

Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individuais adequados.

5.8.1. Padronização da concentração celular

Para determinar a concentração celular a ser utilizada no ensaio de recuperação viral *in vitro*, células BHK-21 cultivadas como descrito no item 5.5.2.1 foram semeadas em placas de 96 poços nas concentrações $3,0 \times 10^4$ ϕ /mL, $1,5 \times 10^4$ ϕ /mL, $7,5 \times 10^3$ ϕ /mL, $3,75 \times 10^3$ ϕ /mL e $1,875 \times 10^3$ ϕ /mL em 150 µL de MCPI 2,5% e incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas.

Este experimento foi realizado em triplicata e a concentração celular que, ao final das 72 horas, apresentou as melhores características de adesão, formação do tapete celular com no mínimo de 80% de confluência e conservação das características ideais do meio de cultura, foi definida como padrão para a realização do ensaio de inativação viral *in vitro*.

Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.8.2. Determinação de concentração de SFB ideal de cultivo

Para determinação da concentração ideal de suplementação do meio de cultura com SFB, foi analisada a taxa de recuperação viral obtida em porcentagem de poços positivos após revelação da placa de 96 poços com a técnica de IFD.

A avaliação da concentração de SFB adicionada ao meio de cultivo foi realizada com células BHK-21 incubadas na concentração de $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL por 24 h, inoculadas com VRT nas concentrações 0,01-1000 TCID₅₀/mL e incubadas com MCPI contendo 0, 1, 2,5 e 3% de SFB a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas. Após este período foi realizada a IFD para determinação da recuperação viral, onde os poços foram considerados positivos quando da presença de pelo menos um foco fluorescente.

Todos os ensaios foram testados em triplicata e a manipulação experimental foi realizada em fluxo laminar vertical com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.8.3. Determinação de temperatura ideal de cultivo

A determinação da temperatura ideal de cultivo das células BHK utilizadas no ensaio de recuperação viral foi realizada conforme descrito no item anterior.

Células BHK-21 foram incubadas na concentração de $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL por 24 h, inoculadas com VRT nas concentrações 0,01-1000 TCID₅₀/mL e em meio de cultura contendo 2,5% de SFB, incubadas nas temperaturas de 35 e 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas. Após este período foi realizada a IFD para determinação da recuperação viral, onde os poços foram considerados positivos quando da presença de pelo menos um foco fluorescente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a manipulação experimental foi realizada em fluxo laminar vertical com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.8.4. Determinação de tempo de incubação ideal de cultivo

Por último foi determinado o tempo de incubação, desta vez incubando as células BHK-21 como dito anteriormente, com meio de cultura contendo 2,5% de

SFB e a 37°C, em estufa com tensão de CO₂ a 5%, mas por 48, 72 e 96 horas. Novamente foi realizada a IFD para avaliação da recuperação viral, onde os poços foram considerados positivos quando da presença de pelo menos um foco fluorescente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a manipulação experimental foi realizada em fluxo laminar vertical com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.8.5. Avaliação de subcultura para potencialização da recuperação viral

Para avaliar a utilização do recurso de subcultivo para a potencialização da recuperação viral e avaliar a interferência de aditivos utilizados na formulação da vacina e grandes quantidades de partículas virais inativadas na replicação viral de vírus residual contido nas amostras, foi realizado o ensaio de inativação viral com a subcultura das placas da seguinte maneira:, após a incubação de amostras de SV contaminadas com VRT na concentração de 20 TCID₅₀, em MCPI 2,5%, a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas, 50 µL do sobrenadante de cada poço desta placa original, foi inoculado em uma nova placa de 96 poços com células BHK-21 recém-semeadas (primeira subcultura). A placa de cultura original foi corada para avaliação das células infectadas e a placa da primeira subcultura foi incubada a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 48-72 horas. Da mesma forma, ao final da incubação, 50 µL de cada poço foram transferidos para uma placa nova recém-semeada (segunda subcultura). A placa da primeira subcultura foi corada para avaliação das células infectadas e a placa da segunda subcultura foi incubada a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 48-72 horas e posteriormente corada para avaliação das células infectadas. Os resultados das IFD das placas original e subculturas foram comparadas para determinar o melhor método de ensaio de recuperação viral *in vitro*.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a manipulação experimental foi realizada em fluxo laminar vertical com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.8.6. Determinação de limite de detecção

A determinação do limite de detecção do ensaio de recuperação viral foi realizada da seguinte maneira: células BHK-21 semeadas em placas de 96 poços na concentração ideal previamente determinada foram incubadas com MCPI suplementado com concentração ótima de SFB, incubadas por 24 horas na temperatura estabelecida. Concentrações crescentes de VRT (10^{-4} a 10^3 TCID₅₀/mL) foram inoculadas e incubadas por 2 horas na mesma temperatura. Após este período, o sobrenadante foi descartado e meio de cultura novo foi adicionado às células que foram então incubadas novamente por tempo determinado em ensaio anterior. Após o período de incubação foi realizado o ensaio de IFD para contabilização de poços positivos.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a manipulação experimental foi realizada em fluxo laminar vertical com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.9. AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DA VACINA ANTIRRÁBICA

Após estabelecido o método do ensaio de recuperação viral *in vitro*, foram avaliados os produtos intermediários do processo de produção da vacina antirrábica Rhabdocell: suspensão viral inativada (SVI), suspensão inativada formulada (SVIF) e suspensão viral inativada formulada homogeneizada (SVIFH).

Células BHK-21 foram incubadas em placas de 96 poços na concentração de $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL por 24 horas, após este período 5 mL das diferentes amostras descritas acima foram diluídas em 15 mL de MCPI 2,5%, inoculadas nas células previamente plaqueadas e incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas.

O crescimento e adesão celular foram avaliados a cada 24 horas no microscópio ótico e, após as 72 horas de incubação, foi realizada a técnica IFD em placa conforme descrito no item anterior.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individuais adequados.

5.10. COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE ENTRE OS ENSAIOS DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO* E *IN VIVO*

A sensibilidade dos ensaios de vírus vivo residual *in vivo* e *in vitro* foi comparada da seguinte forma: foram adicionadas nas amostras de SVI concentrações decrescentes de VRT (10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} TCID₅₀/mL) utilizando a técnica de diluição seriada. Para os ensaios *in vitro*, 5 mL de amostras foram misturadas a 15 mL de MCPI 2,5% e foi realizado o ensaio de recuperação viral em placa, conforme descrito anteriormente. Os ensaios *in vivo* foram realizados conforme descrito no item 5.7 com as mesmas amostras de SVI adicionadas de VRT descritas acima.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Toda a manipulação foi realizada em fluxo laminar vertical e com uso de equipamentos de proteção individual adequados.

5.11. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR

5.11.1. Extração do material genético

O RNA viral foi extraído das amostras de suspensão viral utilizando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche, Inc) seguindo as orientações do fabricante.

O kit baseia-se na purificação de RNA viral por afinidade. Primeiramente a amostra é incubada com um tampão de lise e proteinase K, uma protease com função desnaturante. Após lisada, a amostra é precipitada com tampão de ligação e os ácidos nucleicos são absorvidos na coluna de sílica enquanto outras moléculas presentes são descartadas. O material é purificado por uma série de lavagens com tampão específico visando retirar o material orgânico ligado inespecificamente à coluna, como por exemplo, proteínas e nucleases. O último passo é a eluição do RNA com água purificada livre de RNAses.

A quantidade de material extraído foi calculada em espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop 2000c* utilizando 1 µL do RNA extraído para o parâmetro de RNA, sendo considerada a leitura da relação de absorbância A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1,9 e 2,1 uma extração com alto nível de pureza oligonucleica.

5.11.2. RT-qPCR pelo método de detecção TaqMan

O ensaio quantificação de material genético pela reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa (RT-qPCR) é uma técnica de biologia molecular para amplificação e quantificação de RNA. Primeiramente a transcriptase reversa converte o RNA em DNA complementar (cDNA), que então é amplificado pela reação de PCR. O primeiro passo é a desnaturação da dupla fita de cDNA por aumento da temperatura da reação, seguida pela anelação dos iniciadores e posterior polimerização da fita nova complementar à molde pela enzima Taq-polimerase, a uma temperatura um pouco mais baixa. Esses passos, ou ciclos, são repetidos várias vezes alterando as temperaturas, e a cada novo ciclo a quantidade de DNA é dobrada.

O método de detecção TaqMan utiliza sondas de hidrólise com um agente fluoróforo na porção 5' e um agente extinguidor na porção 3', onde o extinguidor é responsável por inibir a emissão de fluorescência pelo fluoróforo. Durante a amplificação pela PCR, a sonda hibridiza com as sequências alvo no cDNA e quando a Taq-polimerase a encontra, causa sua clivagem por também possuir atividade 5'-nuclease. O fluoróforo é liberado, produzindo a fluorescência que é captada pelo sistema de detecção do equipamento em que a reação é realizada. A emissão de fluorescência é equivalente à quantidade de cDNA produzido na reação.

As condições do ensaio foram estabelecidas de acordo com a bula do kit *TaqMan One Step RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc). O volume total de reação foi de 15 µL, com 200 nM do iniciador reverso e senso, 100 nM da sonda de hidrólise e 5 µL de RNA. A amplificação foi realizada no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (AB Applied Biosystems, Inc) com as seguintes condições de ciclagem: 50°C por 30 min (cDNA), 95°C por 2 min (ativação) seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg (desnaturação) e 60°C por 1 min (hibridização e polimerização).

5.11.3. Desenho dos iniciadores e sondas

Foram utilizados dois grupos de iniciadores e sondas de hidrólise para amplificação e quantificação do gene N, codificante para a nucleoproteína do vírus rábico (RABVgp1). O grupo 1 foi desenhado utilizando o software *Primer Designer* (versão 1.2.4, Applied Biosystems, EUA). Os critérios para a escolha dos

oligonucleotídeos foram: produzir amplicon com tamanho de 80 a 200 pares de base; oligonucleotídeos com comprimento entre 20 e 24 pares de base e temperatura de ligação (T_m) de $59 \pm 2^\circ\text{C}$; proporção C:G correspondente a 40-60%, sem estruturas secundárias significantes e sem formação de *dimers*; sonda com comprimento de 20 a 30 pares de base com T_m 7 a 10°C acima da T_m dos oligonucleotídeos; sonda com mais Cs do que Gs e sem Gs perto do fluoróforo (NOLAN; HUGGETT; SANCHEZ, 2013). Já o grupo 2 foi descrito no estudo realizado por Faye e colaboradores (FAYE et al., 2017). Também foram utilizados iniciadores e sonda para a amplificação do mRNA β -actina de células BHK-21 descrito por Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2015), utilizado como controle interno da reação. A Tabela 2 traz as características dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

TABELA 2: OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO.

Nome	Tipo (Sentido)	Tamanho do oligo. (pb)	Sequência 5'-3'	Gene	Posição ^a	T_m ^b	Tamanho do amplicon (nt)
RABV-FN1	Primer (S)	23	GAAGAGATCGCACATACGGAGAT	Rabies Virus Nucleo-protein	1260-1282	58	82
RABV-RN1	Primer (R)	22	TGTTTAGAACTCGGCGAATGA		1342-1321	58	
RABV-PR1	Sonda (S)	30	6FAM-AGTCAGTTCCAATCATCAAGCTCGTCCAAA-BBQ		1290-1319	69	
RABV-FN2	Primer (S)	20	GCTCTGGGCTGGTGTCTGTTT	Rabies Virus Nucleo-protein	707-726	59	192
RABV-RN2	Primer (R)	20	TACGGGGACTTCCCCTCAG		880-899	59	
RABV-PR2	Sonda (S)	23	6FAM-CGAGCCARGGCAGGAGACTGCGG-BBQ		819-841	68	
ACTB-R	Primer (S)	25	CAGCACCATGAAGATCAAGATCATT	BHK-21 cells B-actin	1083-1107	60	131
ACTB-F	Primer (R)	22	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT		1213-1192	60	
ACTB-P	Sonda (S)	25	VIC-TCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BBQ		1159-1183	65	

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: oligo, oligonucleotídeo; S, senso; R, reverso; pb, pares de bases; 6FAMTM, 6-carboxifluoresceína; VIC[®], 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína; BBQ, blackberry quencher; nt, nucleotídeos.

^a Posição dos nucleotídeos correspondente ao RABVgp1 (GenBank Ac. No. 001542.1), e do Mesocricetus auratus b-actin mRNA (GenBank Ac. No. AJ312092). ^b Temperatura de *melting* ($^\circ\text{C}$).

5.11.4. Padronização do RT-qPCR

Para a padronização da técnica foram analisados os parâmetros de especificidade dos oligonucleotídeos, linearidade da reação, eficiência (E), coeficiente de correlação (R^2), limite de quantificação e limite de detecção da reação, repetibilidade inter e intra-ensaios da reação.

Primeiramente foi realizada a determinação da concentração ideal de uso dos iniciadores e sonda dos grupos 1 e 2 para amplificação do vírus rábico (RABV-FN1, RN1 e PR1), com as concentrações descritas na Tabela 3.

Após a determinação de concentração de oligonucleotídeos a serem utilizados nas reações de RT-qPCR, foi realizada a construção da curva-padrão para avaliação da eficiência de reação e coeficiente de correlação. Foi utilizada amostra de SV com titulação viral de $1 \times 10^{5,78}$ TCID₅₀/mL e realizada diluição seriada na base 10 para atingir as concentrações 10^1 a 10^6 TCID₅₀/mL. Nesta etapa foi realizada também a comparação das eficiências das reações *singleplex*, onde somente continham oligonucleotídeos para a quantificação do RABV, e *duplex*, com oligonucleotídeos para a quantificação do RABV e para a identificação do controle interno, mRNA β -actina de células BHK-21, utilizados conforme descrito por Zhang et. al. (2015), na concentração de 200 nM de iniciadores e 100 nM de sonda por reação de amplificação.

TABELA 3: CONCENTRAÇÕES DOS INICIADORES E SONDA UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE RT-qPCR PARA O GENE RABVGP1.

Amostra	Iniciadores	Sonda
AM1	200nM	100nM
AM2	200nM	200nM
AM3	200nM	300nM
AM4	400nM	100nM
AM5	400nM	200nM
AM6	400nM	300nM
AM7	500nM	100nM
AM8	500nM	200nM
AM9	500nM	300nM

FONTE: O autor (2019).

A próxima etapa foi a determinação da linearidade da reação. Para tanto foi construída uma curva de calibração com amostra de SV com titulação viral de $1 \times 10^{5,78}$ TCID₅₀/mL e realizada diluição seriada para atingir as concentrações 10^0 a 10^6 TCID₅₀/mL.

Os ensaios de repetibilidade inter e intra-ensaios foram realizados com 20 replicatas de diluições seriadas na base 2 para atingir as concentrações 10^{-1} a 10^2 TCID₅₀/mL. As reações de quantificação foram realizadas por operadores e em dias diferentes.

A especificidade da reação foi testada avaliando amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano positivas para outros vírus causadores de meningoencefalites: enterovírus não-polio, citomegalovírus, herpesvírus 2, vírus varicela zoster, herpesvírus 1, eritrovírus B19, herpesvírus 6 humano e Epstein-Barr vírus.

5.12. VALIDAÇÃO INICIAL DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*

Para a avaliação do método de vírus vivo residual *in vitro* foram então combinados os ensaios de recuperação viral *in vitro* e RT-qPCR da seguinte forma: foi realizado o ensaio de recuperação viral como descrito no item 5.9 em placas de 96 poços e coletadas amostras nos tempos 0 e 72 horas de incubação para extração de material genético e quantificação viral pelo ensaio de RT-qPCR padronizado acima. O ensaio foi realizado seguindo o *check-list* do ANEXO 2.

Resultados de porcentagem de focos fluorescentes obtidos pela IFD e de quantificação viral de amostras de 72 horas de incubação maiores que valores encontrados para 0 horas indicam que existe vírus ativo replicando naquela respectiva amostra. As imagens da IFD foram obtidas em microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI6000B) pelo software LAS AF, realizado pela Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica – RPI 07C – do Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz em Curitiba-PR.

Dez amostras de SVI produzidas durante o ano de 2017, fornecidas pelo CDI – TECPAR, foram analisadas para a validação inicial do ensaio de inativação viral *in vitro*, conforme descrito anteriormente.

As imagens foram adquiridas em aumento de 40 vezes, em microscópio óptico de fluorescência Leica DMI6000B (Leica, AL) e processadas em software

próprio LAS AF (Leica, AL) disponibilizado pela Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz em Curitiba-PR.

5.13. IDENTIFICAÇÃO VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foi realizado o ensaio de inativação viral *in vitro* em amostras de SVI produzidas em 2017 no laboratório de produção de vacina rábica CDI – TECPAR, e as amostras foram inoculadas em garrafas T25 para recuperação de maior número de células necessário para a análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Este ensaio foi realizado da seguinte maneira: 5 mL de amostras de SVI foram diluídas em 15 mL de MCPI 2,5%, inoculadas em garrafas T25 previamente semeadas com $3,3 \times 10^4$ ϕ /cm² de células BHK-21 e incubadas a 37°C em estufa com tensão de CO₂ a 5% por 72 horas. Da mesma forma, uma garrafa T25 contendo a mesma concentração de células BHK-21 foi incubada somente com MCPI 2,5%, utilizada como controle negativo (CN), sendo outra incubada com MCPI 2,5% acrescido de 100 μ L de vírus PV, utilizada como controle positivo (CP).

Ao final das 72 horas de incubação o sobrenadante das garrafas foi retirado e as células foram lavadas com 2 mL de PBS aquecido para retirar todo o meio de cultivo, adicionado 1 mL de Tripsina/EDTA aquecida e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C por 2-3 minutos ou até que as células se soltassem. Foi adicionado então 2 mL de MCPI 2,5% em cada garrafa e, com auxílio de uma pipeta, as células foram ressuspensas completamente.

As células foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidade e centrifugadas a 1000 g por 1 min. Os sobrenadantes foram descartados, foi adicionado 1 mL de PBS, as células foram ressuspensas e novamente centrifugadas. Este processo foi repetido mais uma vez e foi então adicionado 500 μ L de meio fixador (4% de paraformaldeído + 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) em cada tubo, ressuspensas as células uma última vez e deixadas por 1 hora a temperatura ambiente para que o meio fixador agisse de maneira ótima. Após este período, as células foram centrifugadas e armazenadas a 2-8°C até o momento de processamento para o ensaio de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os sobrenadantes das garrafas de amostras de SVI foram armazenados a -20 °C até sua inoculação em camundongos adultos e lactantes para a realização de ensaio de vírus vivo residual *in vivo*, conforme descrito no item 5.7, para determinar a capacidade infectiva dessas amostras e avaliar os cérebros desses camundongos por MET e ensaio de histologia.

Para tanto, foi coletado material biológico de quatro animais: um camundongo que apresentou sintomas característicos de raiva durante a realização do ensaio *in vivo*, um que não apresentou nenhum sintoma específico durante o período de avaliação do ensaio, um camundongo não inoculado (CN), e um inoculado com o vírus rábico e que apresentou sintomas da doença (CP). Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, conforme protocolo interno do TECPAR, assim que apareceram os sintomas de raiva para minimizar o sofrimento dos mesmos. Os cérebros foram retirados, cortados ao meio no sentido longitudinal e metade do material foi congelado a -80°C para realização do ensaio para diagnóstico confirmatório de raiva efetuado pelo Centro de Diagnósticos “Marcos Enrietti”, da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR. A outra metade dos cérebros foi utilizada para a realização da análise por MET. Foram realizados cortes de 1x1 mm na região do hipocampo do camundongo que foram armazenados em tubos contendo fixador a 2-8°C até o momento do seu processamento.

O processamento das amostras foi realizado pelo Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz em Curitiba-PR, seguindo procedimento adaptado de Haddad e colaboradores, e a análise em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400 Plus (JEOL, EUA) foi realizada pela Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica – RPPI 017C – do mesmo instituto (HADDAD et al., 2007).

5.14. ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS RÁBICO

O ensaio padrão-ouro para confirmação de infecção por vírus da raiva é o Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) e foi realizado conforme o disposto pela Instrução Normativa nº 8, de 12 de abril de 2012, MAPA, pelo Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR (MAPA,

2012). As amostras de tecido cerebral foram coletadas conforme item 5.13 e armazenadas a -20°C até o momento da realização do ensaio.

As imagens foram adquiridas em aumento de 40 vezes, em microscópio óptico de fluorescência Leica DMI6000B (Leica, AL) e processadas em software próprio LAS AF (Leica, AL) disponibilizado pela Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz em Curitiba-PR.

5.15. HISTOLOGIA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS INFECTADAS COM VÍRUS RÁBICO

A análise histopatológica foi realizada pelo Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Pontifícia Católica em Curitiba-PR. As amostras de tecido cerebral foram coletadas conforme item 5.13 e armazenadas em solução de formol 10% a temperatura ambiente até o momento da realização do ensaio. Os cérebros foram cortados transversalmente, divididos em 3 partes e colocados em cassetes para amostras biológicas, identificados e então realizado o processamento histológico conforme descrito a seguir.

Primeiramente foram realizados banhos sucessivos, de 1 hora cada, no equipamento Histotécnico Leica TP1020 (Leica, AL) de álcool 70%, 80%, 90%, álcool absoluto 3 vezes para a desidratação gradativa das peças, xilol 3 vezes para a diafanização das peças e parafina líquida a 65°C 3 vezes para impregnação em parafina, totalizando 12 horas de processamento. Foram confeccionados blocos de parafina em Inclusor Leica EG1160 (Leica, AL) e, após a inclusão, os blocos foram cortados em Micrótomo Leica RM2145 (Leica, AL) para obter cortes histológicos de 4 ou 5 µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro pré-tratadas com solução de albumina e glicerina e levados à estufa a 60°C para secagem por 1 hora. Por fim, foi realizada a coloração de hematoxilina e eosina e as lâminas foram montadas com resina histológica.

As imagens foram adquiridas em aumentos variados, em equipamento de scanner de lâminas AxioScan Z1 (Zeiss, EUA) e processadas em software próprio, Zen 2.3 (Zeiss, EUA), disponibilizado pelo Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Pontifícia Católica em Curitiba-PR.

5.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise e tratamento dos dados foi realizada em software Excel, versão 2007. Os resultados foram descritos por porcentagem de resultados e médias desses percentuais, com análise descritiva representada por gráficos. Em função do pequeno número de observações não foi realizada análise inferencial (testes estatísticos). O cálculo de dose letal média foi realizado pelo método de probit, utilizando o software NCSS Statistical Software, versão 12 (EUA).

6. RESULTADOS

6.1. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

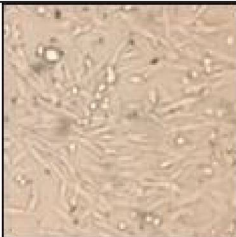
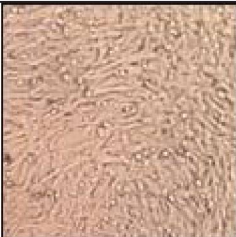
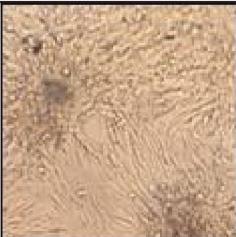
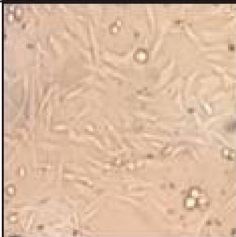
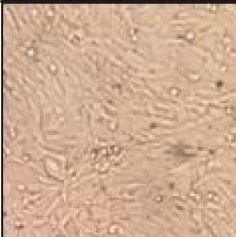

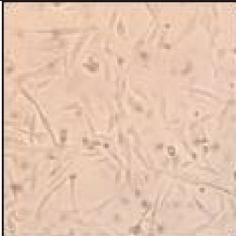


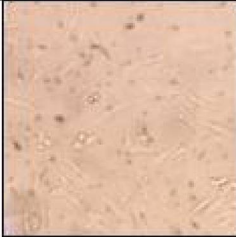


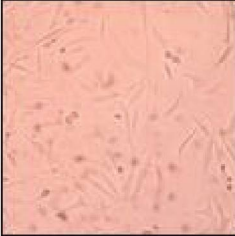
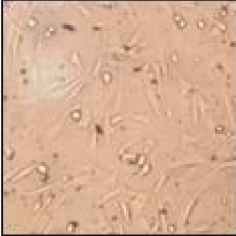
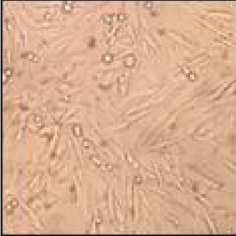
6.1.1. Determinação de concentração ideal de células BHK-21

Para determinar a concentração de inóculo celular inicial ideal para o ensaio de vírus vivo residual, foram avaliadas várias concentrações celulares inoculadas em placas de 96 poços durante 72 horas.

Como demonstrado na Tabela 4, a concentração de $6,0 \times 10^5$ ϕ /mL apresentou grumos ao final das 72 horas de incubação, o que impossibilita a realização do ensaio de IFD. As concentrações abaixo de $1,5 \times 10^5$ ϕ /mL não produziram monocamadas celulares com confluência mínima de 80%, característica necessária para a correta avaliação de recuperação viral por IFD. Já as concentrações de $3,0$ e $1,5 \times 10^5$ ϕ /mL foram as que apresentaram as melhores características ao final do período de avaliação, com confluência ideal para a realização do ensaio de imunofluorescência direta.

Portanto, a concentração celular definida para os ensaios de vírus vivo residual em placa de 96 poços foi $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL. Adicionando 50 μ L de uma suspensão celular nesta concentração são semeadas $1,0 \times 10^4$ células por poço, resultando numa densidade de $3,3 \times 10^4$ ϕ /cm².

TABELA 4: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS BHK-21 EM DISTINTOS PERÍODOS DE TEMPO.

Concentração celular x tempo	24 hr	48 hr	72 hr
$6,0 \times 10^5 \phi/\text{mL}$			
$3,0 \times 10^5 \phi/\text{mL}$			
$1,5 \times 10^5 \phi/\text{mL}$			
$7,5 \times 10^4 \phi/\text{mL}$			
$3,75 \times 10^4 \phi/\text{mL}$			

FONTE: O autor (2019).

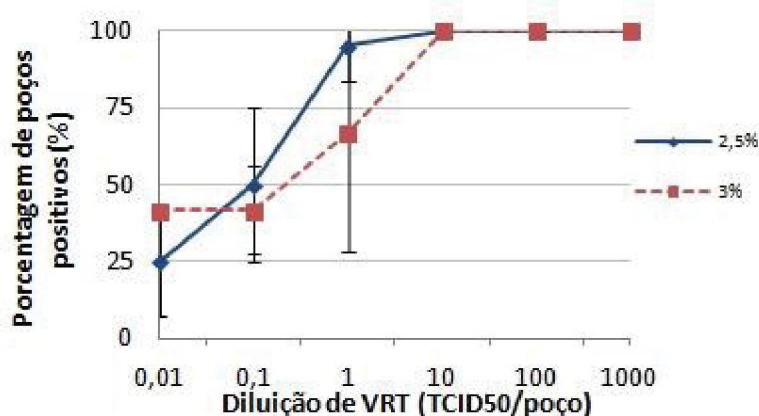
LEGENDA: Células BHK-21 em diferentes concentrações, plaqueadas em placa de 96 poços, 50 μL por poço, cultivadas em MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 72 hr. Aumento de 10x em microscópio ótico.

6.1.2. Determinação de condições ótimas de meios e suplementos para o cultivo celular

Para determinar a concentração ideal de SFB suplementado ao meio de cultivo das células BHK-21 utilizadas para o ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, foram analisadas as concentrações de 0, 1, 2,5 e 3% de SFB. O resultado está apresentado na Figura 6, com a representação gráfica da média de recuperação viral de 3 ensaios independentes.

Os ensaios realizados para determinar a concentração ideal de suplementação do meio de cultura MCPI revelaram que as células incubadas com MCPI sem suplementação de SFB ou com apenas 1% de SFB não tiveram crescimento adequado, evidenciando a importância deste suplemento. Já quando o meio de cultivo foi suplementado com 2,5 e 3% de SFB, não foi observada diferença na taxa de recuperação viral entre as concentrações analisadas, portanto, foi determinado que o ensaio de cultivo e recuperação viral seria realizado com meio de cultivo suplementado com 2,5% de SFB.

FIGURA 6: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SFB SUPLEMENTADO AO MEIO DE CULTIVO.



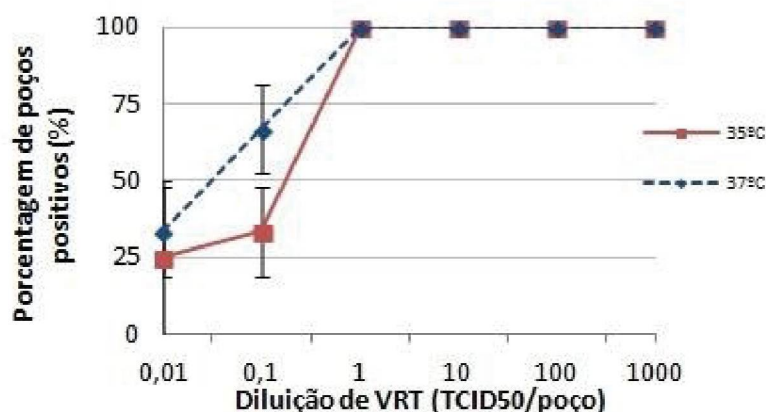
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 comparando incubação com MCPI 2,5 e 3% SFB, à 37°C por 72 hr. VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose 50%*.

Na avaliação da temperatura ideal de cultivo, conforme evidenciado na Figura 7, com a representação gráfica da média de recuperação viral de 3 ensaios independentes, pôde ser observada uma maior recuperação viral quando as células foram incubadas a 37°C, portanto esta foi a temperatura padrão de incubação nos ensaios subsequentes.

Após as determinações de suplementação com SFB e temperatura de incubação, foi analisado o tempo de incubação para a melhor recuperação viral. Mesmo sem ser identificada diferença entre as taxas de recuperação viral nos diferentes tempos de incubação apresentada na Figura 8 com a representação gráfica da média de 3 ensaios, foi determinado o tempo de 72 horas como o ideal para ensaios subsequentes.

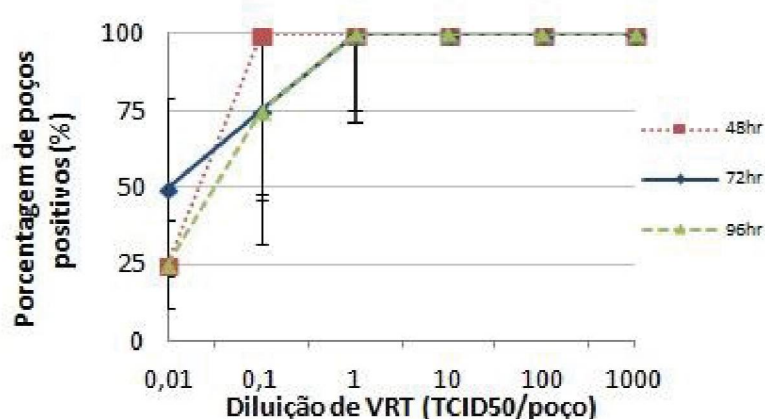
FIGURA 7: ANÁLISE DE VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO PARA ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 comparando incubação com MCPI 2,5% SFB, à 35 e 37°C por 72 hr. VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose 50%*

FIGURA 8: ANÁLISE DE VARIAÇÃO DE TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA ISOLAMENTO DO VÍRUS RÁBICO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 comparando incubação com MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 48, 72 e 96 hr. VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose* 50%.

6.1.3. Análise de subcultivo para potencializar a replicação viral

Para determinar se existe alguma inibição de replicação viral pela grande quantidade de partículas virais inativadas ou outros aditivos presentes nas amostras de SV, foi realizado o ensaio de subcultivo. A Tabela 5 mostra a porcentagem de poços positivos encontrados de um total de 92 poços analisados, após cada subcultivo, e pode-se observar que não há ganho de recuperação viral utilizando esta técnica.

TABELA 5: ENSAIO DE SUBCULTIVO CELULAR PARA POTENCIALIZAÇÃO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Replicata	CO	IFD +	
		S1	S2
1 ^a	23	7	7
2 ^a	26	8	6
3 ^a	19	9	2

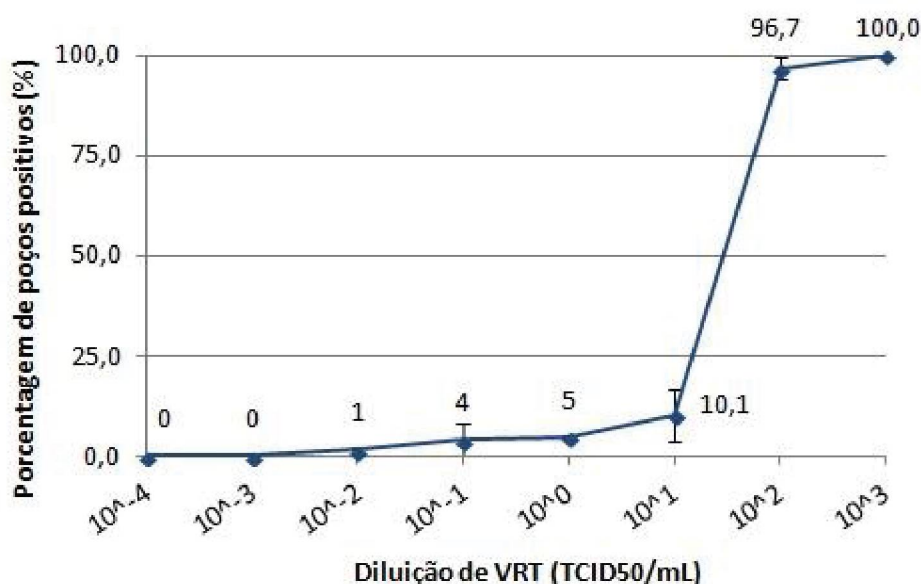
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 incubadas com MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 72 hr, comparando subcultivos primário e secundário. IFD +, poços positivos por imunofluorescência direta de um total de 92 poços analisados; CO, cultura original; S1, primeiro subcultivo; S2, segundo subcultivo.

6.1.4. Determinação de limite de detecção de recuperação viral *in vitro* com distintas concentrações virais

O limite de detecção (LOD) do ensaio de recuperação viral foi determinado pela concentração onde somente um foco de fluorescência foi detectado, sendo considerado apenas um poço positivo, dos 92 analisados na placa de 96 poços (Figura 10). Conforme a representação gráfica da média de 3 ensaios apresentada na Figura 9, o LOD do ensaio está em 10^{-2} TCID₅₀/mL, uma vez que abaixo desta concentração de vírus rábico ativo não é mais possível identificar poços positivos pela técnica de IFD em placa.

FIGURA 9: ENSAIO DE LIMITE DE DETECÇÃO DE RECUPERAÇÃO VIRAL.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 incubadas com MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 72 hr, com concentrações crescentes de VRT. VRT, vírus rábico de trabalho; TCID₅₀, *tissue culture infective dose 50%*.

FIGURA 10: IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DA PLACA CONTENDO 10^{-2} TCID₅₀/ML DE VRT



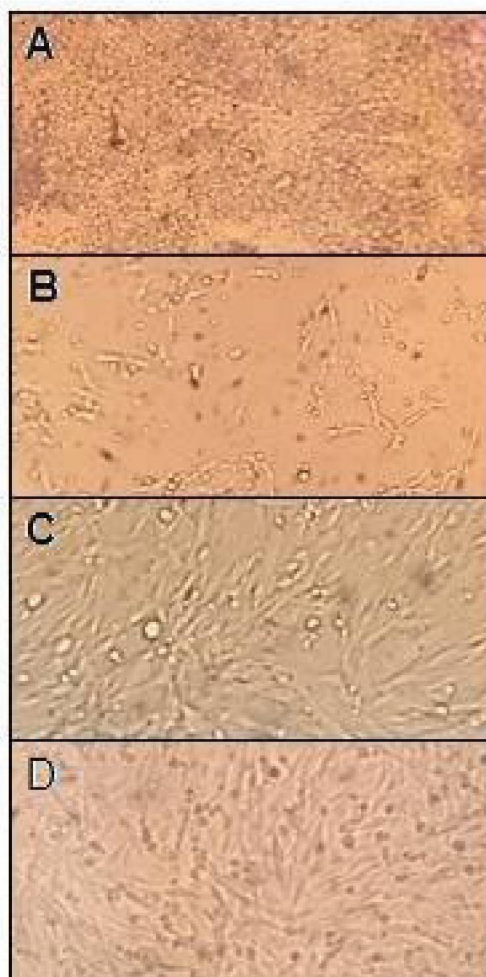
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Imunofluorescência direta em placa de 96 poços com células BHK-21 incubadas com SVI adicionada de 10^{-2} TCID₅₀/mL de VRT, marcadas com anticorpo antinucleocapsídeo rábico conjugado ao FITC. Aumento de 400x.

6.2. AVALIAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE VACINA ANTIRRÁBICA VETERINÁRIA

Ao serem testadas amostras de diferentes etapas do processo de produção da vacina antirrábica veterinária, pôde ser observado que SVIF e SVIFH que contém, respectivamente, timerosal, um agente conservante, e hidróxido de alumínio, adjuvante da vacina, não podem ser utilizados para o ensaio de determinação de vírus rábico viável residual. Estes produtos químicos utilizados para a formulação de vacina interferem no crescimento e causam morte das células BHK-21 utilizadas para o ensaio de recuperação viral (Figura 11: A e B). Somente os ensaios com suspensão viral inativada com adição de sacarose, porém sem a adição dos químicos acima apresentaram crescimento celular normal (Figura 11: C), sendo este o produto intermediário escolhido para a validação inicial do ensaio de inativação viral *in vitro*.

FIGURA 11: AVALIAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE VACINA EM ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO.



FONTE: O autor (2019)

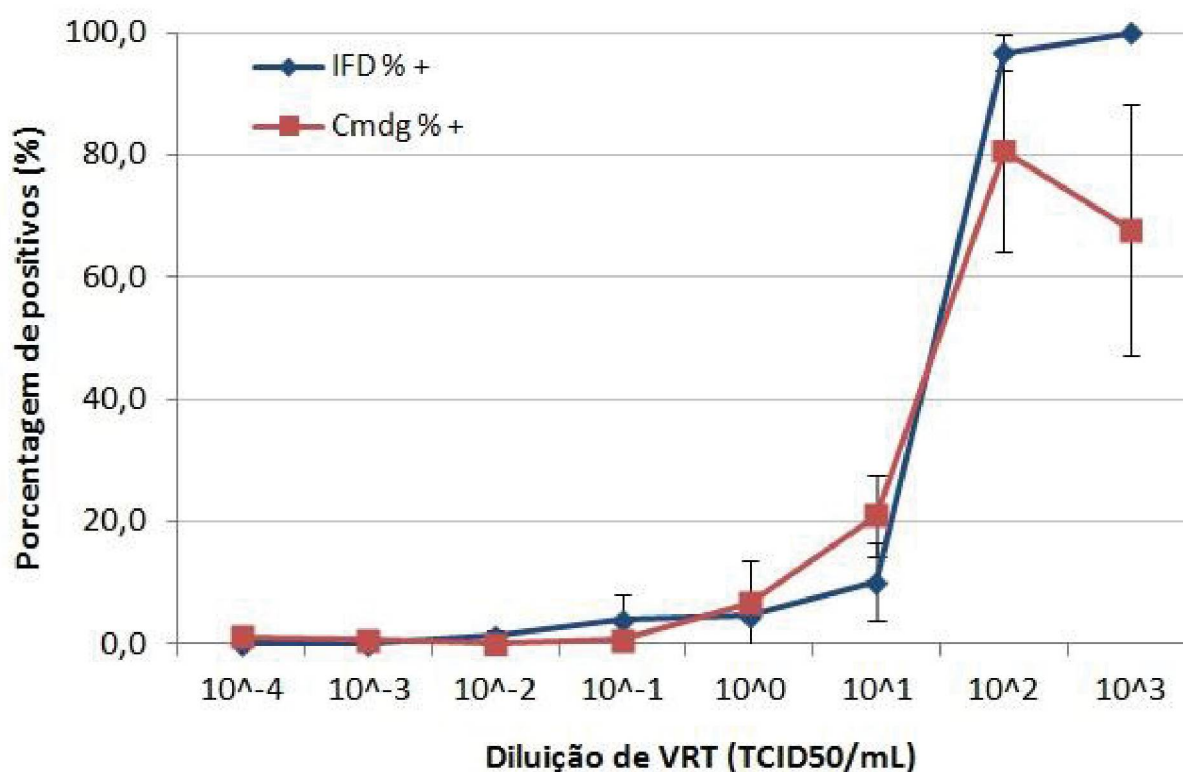
LEGENDA: Células BHK-21 inoculadas com (A) SVIFH com hidróxido de alumínio, (B) SVIF com timerosal, (C) SVI com sacarose, e (D) controle negativo, sem adição de inóculo, incubadas com MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 48 hr. Aumento de 100x.

6.3. COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE ENTRE O MÉTODO *IN VITRO* E *IN VIVO*

O estudo da comparação de sensibilidade dos métodos de recuperação viral *in vitro* e ensaio de vírus residual *in vivo* foram realizados com amostras de suspensão viral inativada adicionados de diferentes concentrações de VRT e os resultados de 3 ensaios independentes estão apresentados em forma de gráfico na Figura 12. Pode ser observado que as duas curvas são similares, o que indica que ambos os testes têm sensibilidade semelhante.

Foram realizados os cálculos da Dose Letal Mediana (DL50) para o ensaio *in vivo* e Dose Infecciosa Mediana de Cultivo Celular (DICC50) para o ensaio *in vitro* pela análise de *probit*. O valor de DICC50 encontrado foi relativamente menor que o DL50, 19,70 ($\pm 3,33$) e 67,48 ($\pm 23,20$) TCID50/mL, indicando que o ensaio *in vitro* é 3,42 vezes mais sensível que o *in vivo*.

FIGURA 12: ENSAIO DE COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE ENTRE OS MÉTODOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE RECUPERAÇÃO VIRAL.



FONTE: O autor (2019).

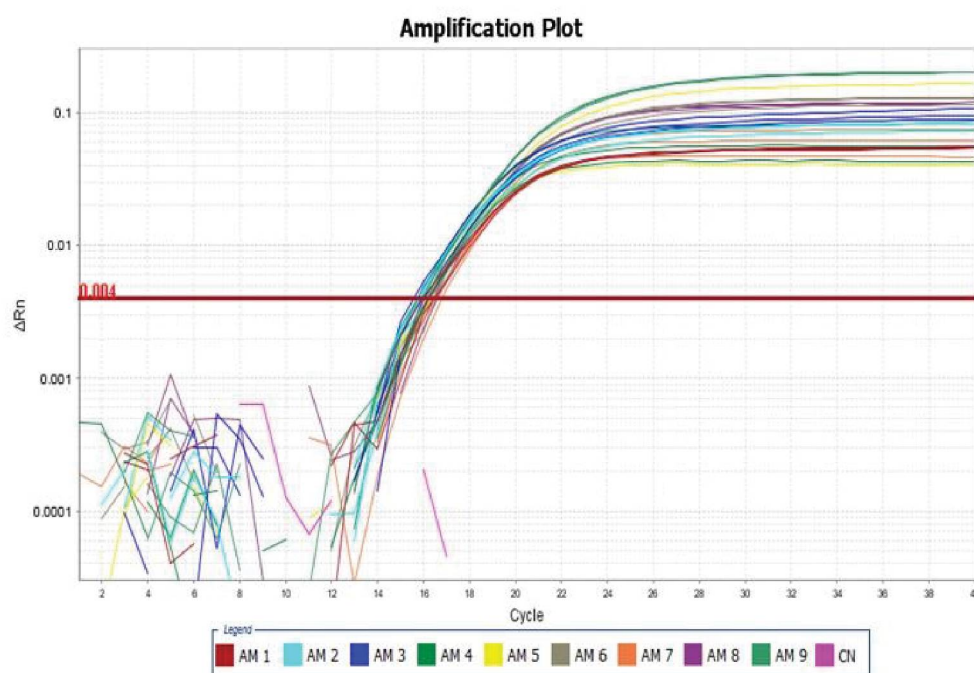
LEGENDA: Taxa de recuperação viral em células BHK-21 incubadas com MCPI 2,5% SFB, à 37°C por 72 hr (linha azul) e taxa de óbito em camundongos inoculados (linha vermelha), ambos com concentrações crescentes de VRT. VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose* 50%; IFD%+, porcentagem de poços positivos em imunofluorescência direta; Cmdg%+, porcentagem de camundongos positivos para raiva no ensaio *in vivo*.

6.4. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR MÉTODO MOLECULAR

O primeiro ensaio realizado foi a determinação das concentrações ideais de iniciadores e sonda utilizados para a reação de RT-qPCR. As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados de amplificação do gene RABVgp1 utilizando 5 µL de RNA extraído de amostra de SV com titulação viral de $1 \times 10^{5,78}$ TCID₅₀/mL com oligonucleotídeos do grupo 1 e do grupo 2, respectivamente.

Todas as combinações de concentrações de oligonucleotídeos do grupo 1 testadas foram satisfatórias, portanto foram escolhidas as menores concentrações para as próximas etapas da padronização da técnica de RT-qPCR para o gene RABVgp1, ou seja, 200 nM de iniciadores senso e reverso e 100 nM de sonda por reação de amplificação. Entretanto os iniciadores e sonda do grupo 2 (RABV-FN2, RN2 e PR2) não produziram resultados satisfatórios.

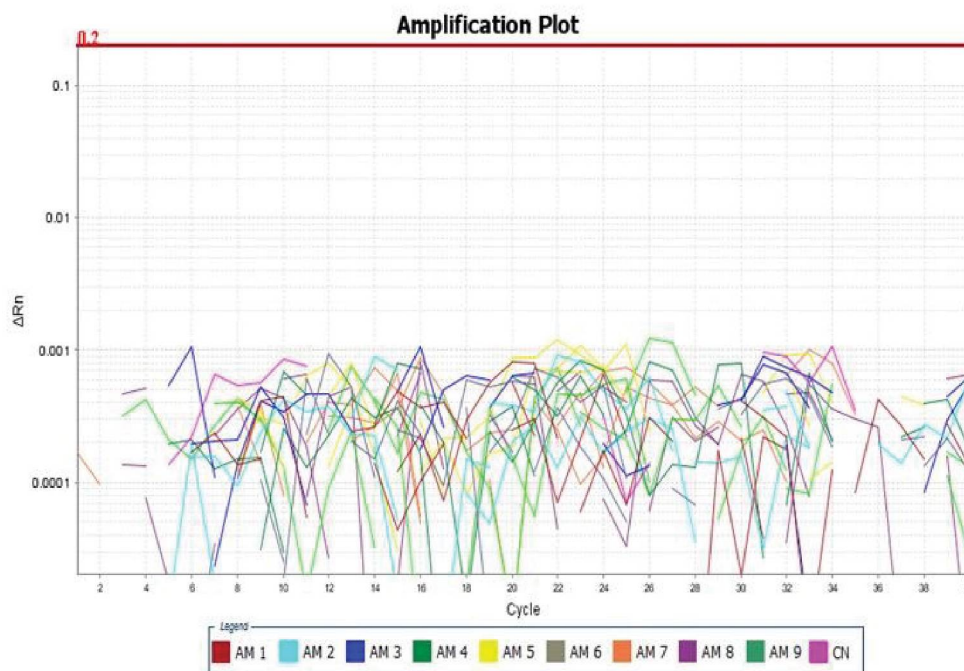
FIGURA 13: AMPLIFICAÇÃO DO GENE RABVGP1 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INICIADORES E SONDA DO GRUPO 1.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Plotagem de reação de amplificação do gene RABVGP1 com diferentes concentrações de iniciadores e sonda do grupo RN1. ΔRN, magnitude do sinal gerado. Cycle: ciclo de quantificação.

FIGURA 14: AMPLIFICAÇÃO DO GENE RABVGP1 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INICIADORES E SONDA DO GRUPO 2.



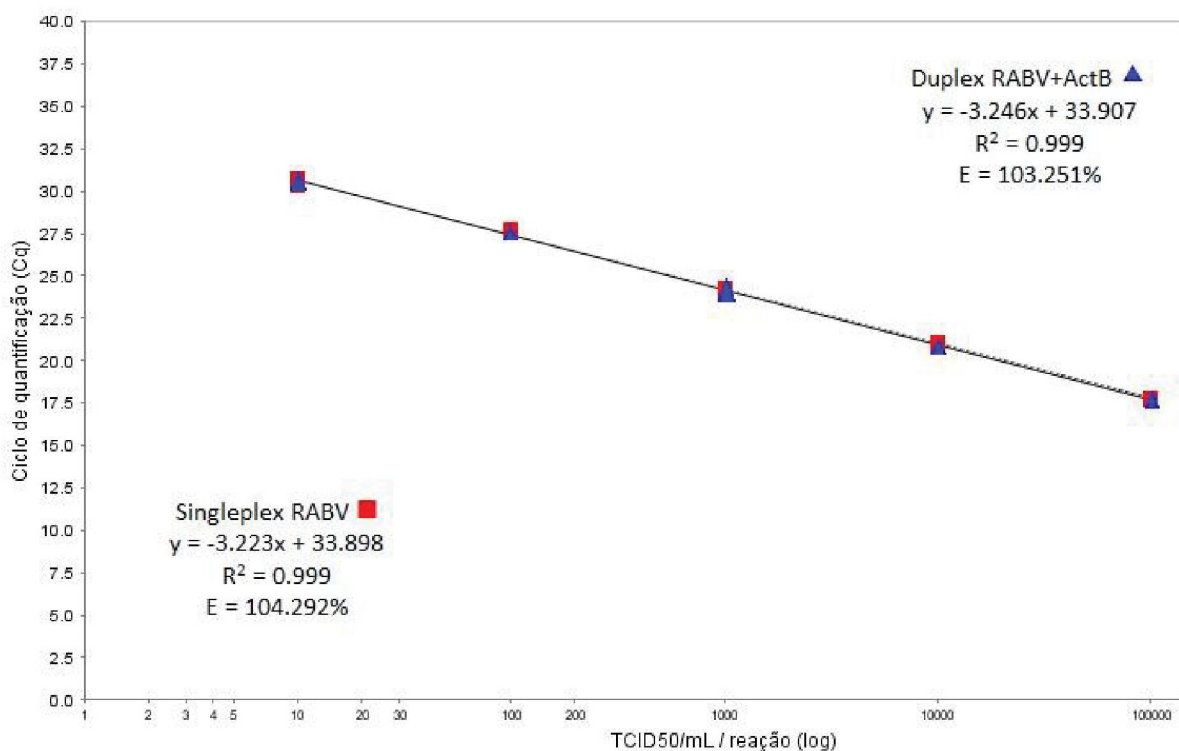
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Plotagem de reação de amplificação do gene RABVGP1 com diferentes concentrações de iniciadores e sonda do grupo RN2. ΔRn , magnitude do sinal gerado. Cycle: ciclo de quantificação.

A segunda etapa da padronização foi a construção da curva padrão para avaliar a eficiência dos iniciadores. A Figura 15 apresenta os resultados da curva padrão assim como da comparação das reações *singleplex* e *duplex*, e mostra que os dois sistemas possuem alta eficiência, o que garante que a identificação do controle interno mRNA β -actina de células BHK-21 não interfere na quantificação do RABV e a reação duplex pode ser utilizada.

Seguiu-se, portanto, com a padronização do ensaio de RT-qPCR utilizando a reação *duplex* com iniciadores e sondas do grupo 1 para a quantificação do vírus rábico e para a amplificação do controle interno.

FIGURA 15: CURVA PADRÃO PARA O GENE RABVGP1 COM OS INICIADORES E SONDA DO GRUPO 1 E COMPARAÇÃO DAS REAÇÕES *SINGLEPLEX* E *DUPLEX*.



FONTE: O autor (2019).

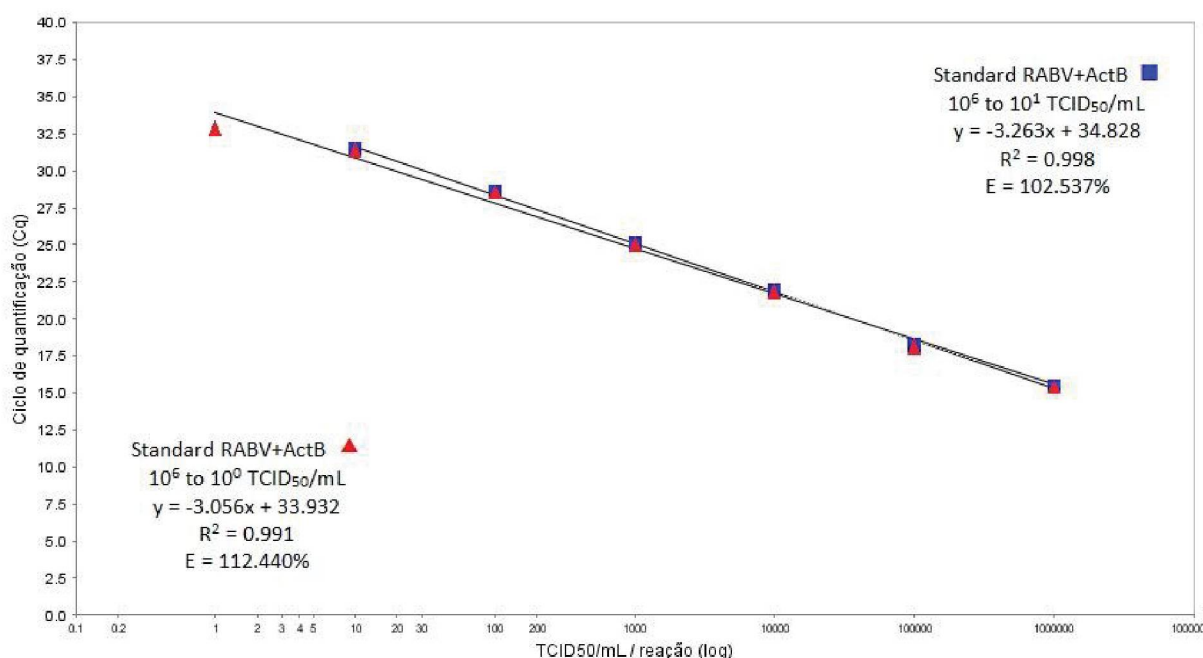
LEGENDA: Triângulo azul, ensaio RT-qPCR *duplex* – quantificação do RABV e identificação do ActB na mesma reação; Quadrado vermelho, ensaio RT-qPCR *singleplex*, somente a quantificação do RABV.

A próxima etapa foi a determinação da variação de linearidade da reação. Conforme curvas mostradas na Figura 16, a reação duplex para quantificação do vírus rábico é linear de 10^1 a 10^6 TCID50/mL, pois nesta faixa a reação apresenta eficiência (E) de 102,5%, com valor de *slope* de -3,246, o que é perto do valor ideal de -3,3, e coeficiente de correlação (R^2) de 0,998, valor que também indica a alta qualidade da reação de quantificação. Quando incluímos o ponto 10^0 TCID50/mL, a eficiência da reação cai para 112%, evidenciando o prejuízo para a linearidade da quantificação. Pode ser observado também que o limite de quantificação (LOQ) da reação foi de 10^1 TCID50/mL, ou seja, a menor quantidade passível de ser quantificada.

Posteriormente, foram realizados ensaios para avaliar a repetibilidade inter e intra-ensaios da reação de quantificação do RABV, sendo os resultados descritos na Tabela 6, com coeficientes de variação (CV) de 9,2% e 6,4%, respectivamente. Com base nesses resultados pode-se determinar o limite de detecção (LOD) de 10^{-1}

TCID₅₀/mL, sendo esta a menor quantidade passível de ser identificada pela reação de RT-qPCR.

FIGURA 16: RESULTADO DA ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE LINEARIDADE DA REAÇÃO DE RT-qPCR.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Quadrado azul, ensaio RT-qPCR *duplex* com pontos da curva de 10^1 a 10^6 TCID₅₀/mL; Triângulo vermelho, ensaio RT-qPCR *duplex* com pontos da curva de 10^0 a 10^6 TCID₅₀/mL.

TABELA 6: RESULTADOS DE REPETIBILIDADE INTER E INTRA-ENSAIOS E LIMITE DE DETECÇÃO DA REAÇÃO DE RT-qPCR.

Intra-ensaio					Inter-ensaio				
RABVgp1			ActB		RABVgp1			ActB	
TCID50/mL	Cq Médio	%CV	Cq Médio	%CV	TCID50/mL	Cq Médio	%CV	Cq Médio	%CV
1,00E+00	31,88	9,2	37,20	2,4	1,00E+00	30,49	6,4	37,26	0,2
1,00E-0,5	32,65	2,9	37,41	3,6					
1,00E-01	33,41	2,5	37,42	3,0					

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: %, porcentagem; Cq, ciclo de quantificação; CV, coeficiente de variação; ActB, mRNA B-actina de células BHK-21; RABVgp1, nucleoproteína de vírus rábico.

Para assegurar a especificidade do sistema e avaliar a ocorrência de reatividade cruzada não específica, foram testadas amostras clínicas positivas para outros vírus causadores de meningoencefalites. Como esperado, cada reação amplificou somente o controle interno, uma vez que mRNA β -actina de células BHK-21 e de humanos são homólogos. A Tabela 7 mostra os valores de Cq de cada reação, onde valores maiores do que o LOD (Cq>33,41) foram considerados negativos.

TABELA 7: RESULTADOS DO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO *DUPLEX* DE RT-qPCR PARA RABV-ATCB.

	Valor de Cq	
	RABVgp1	ActB
RABV	14,92	30,30
BHK-21	37,70	21,53
EV	36,77	24,61
CMV	37,06	32,82
HSV2/VZV	37,73	21,63
HSV1	ind.	36,48
ErithroB19	38,40	32,42
HHV6	37,41	27,39
EBV	ind.	24,21

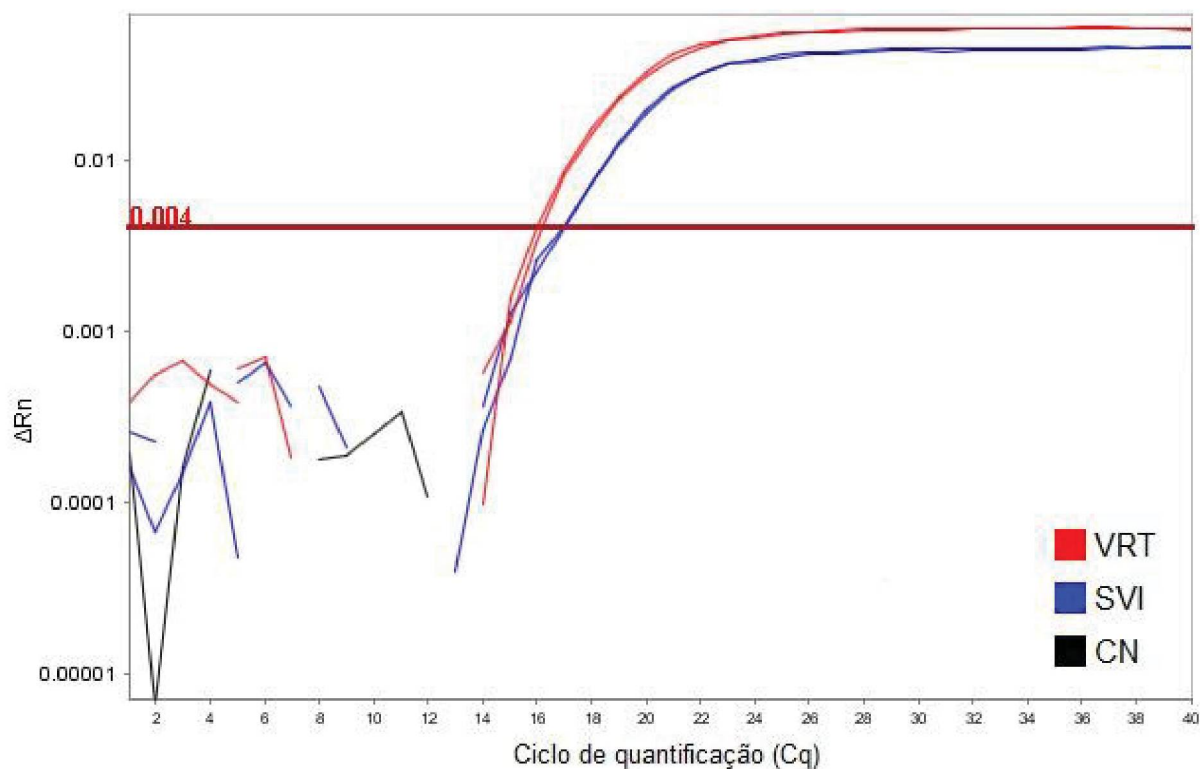
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Cq, ciclo de quantificação; ActB, gene B-actina de células BHK-21; RABVgp1, nucleoproteína de vírus rábico; ind., indeterminado; RABV, cepa vacinal de vírus rábico; BHK-21, linhagem celular de rim de hamster neonato não infectado por vírus rábico; EV, enterovírus não-polio; CMV, citomegalovírus; HSV2/VZV, herpesvírus 2/varicella zoster vírus; HSV1, herpesvírus 1; ErithroB19, eritrovírus B19; HHV6, herpesvírus 6 humano; EBV, Epstein-Barr vírus.

6.5. AVALIAÇÃO DE VÍRUS RÁBICO VACINAL INATIVADO POR MÉTODO MOLECULAR

Os resultados da avaliação da capacidade de identificação de RNA viral danificado após o processo de inativação com o agente alquilante beta-propiolactona pela reação de RT-qPCR padronizada estão descritos na Figura 17. Percebe-se que o método molecular não perde a capacidade de identificar e quantificar o vírus rábico mesmo após sua inativação, uma vez que os valores dos ciclos de quantificação se mantêm muito próximos (Cq VRT = 16,020 e Cq SVI = 16,949).

FIGURA 17: COMPARAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VÍRUS RÁBICO VIÁVEL E INATIVADO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Plotagem de reação de amplificação do gene RABCGP1 avaliando o material genético íntegro (VRT) com o danificado (SVI). ΔRn , magnitude do sinal gerado, VRT, vírus rábico de trabalho; SVI, suspensão viral inativada; CN, controle negativo da reação (água livre de RNase).

6.6. COMBINAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL COM RT-qPCR

Os resultados da combinação entre os ensaios de recuperação viral e quantificação viral por RT-qPCR estão descritos na Tabela 8 e Figura 18. Nota-se que, com a diminuição da concentração de vírus inoculado, também existe a redução de aparecimento de poços positivos identificados por IFD, com o limite de detecção a 10^{-2} TCID₅₀/mL.

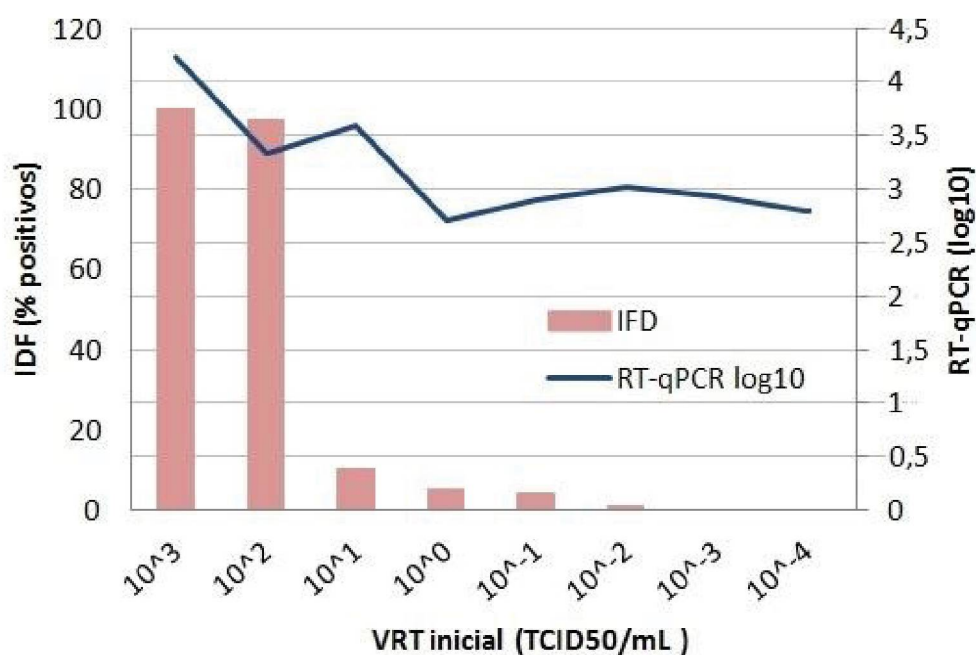
TABELA 8: AVALIAÇÃO DE REAÇÃO DE RT-qPCR COMBINADA COM O MÉTODO DE RECUPERAÇÃO VIRAL *IN VITRO*.

VRT inicial (TCID50/mL)	IFD % + Média	RT-Qpcr					
		0 hr			72 hr		
		Cq	TCID50/mL	log10	Cq	TCID50/mL	log10
10^3	100	14,708	24.237,426	4,38	15,251	16.763,850	4,22
10^2	97	15,096	18.434,324	4,27	18,081	2.096,370	3,32
10^1	10	13,055	81.482,672	4,91	17,202	3.945,859	3,60
10^0	5	13,343	65.749,961	4,82	19,996	517,744	2,71
10^{-1}	4	13,101	78.480,172	4,89	19,438	775,841	2,89
10^{-2}	1	13,238	70.609,859	4,85	19,052	1.060,262	3,03
10^{-3}	0	13,129	77.989,781	4,89	19,285	867,550	2,94
10^{-4}	0	13,656	52.068,297	4,72	19,773	610,769	2,79

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose* 50%; IFD% +, porcentagem de poços positivos identificados por imunofluorescência direta; RT-qPCR, ensaio de quantificação para nucleoproteína de vírus rábico; Cq, ciclo de quantificação.

FIGURA 18: AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL *IN VITRO* COM QUANTIFICAÇÃO POR RT-qPCR.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: VRT, vírus rábico de trabalho; TCID50, *tissue culture infective dose* 50%; IFD% +, porcentagem de poços positivos identificados por imunofluorescência direta; RT-qPCR, ensaio de quantificação para nucleoproteína de vírus rábico; Cq, ciclo de quantificação.

As quantificações por RT-qPCR no tempo 0, de amostras de SVI adicionadas de diferentes concentrações de VRT no momento da inoculação, apresentaram-se todas semelhantes devido a alta concentração de material genético ativo e inativo. Já as amostras após 72 hrs de incubação apresentaram quantificação do RABV decrescente, conforme esperado. Porém, abaixo de 10^1 TCID₅₀/mL, não há mais diferença na quantificação viral pela técnica de RT-qPCR, uma vez que os valores não variam mais que $0,5 \log_{10}$. Este resultado mostra que a técnica de RT-qPCR não é capaz de identificar vírus vivo abaixo desta concentração, como já visto anteriormente no item 6.4, Figura 16, onde foi determinado o LOQ de 10^1 TCID₅₀/mL.

6.7. VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*

Os resultados da validação inicial do ensaio de vírus vivo residual *in vitro* realizados de acordo com o item 5.12 estão descritos na Tabela 9 e Figura 19. Foi realizada a quantificação do vírus rábico vacinal no momento da incubação (0 hr) e ao término da incubação com células BHK-21 (72 hr), assim como a identificação do gene da β -actina das células como controle interno da extração. Ao final do período de incubação foi realizada a IFD para contagem de poços positivos, apresentada em porcentagem.

As 10 amostras de produtos intermediários (SVI) utilizadas neste estudo inicial obtiveram resultados satisfatórios quando analisadas pelo ensaio de vírus vivo residual *in vivo*, conforme item 5.7. As amostras 1 a 8 obtiveram resultados satisfatórios pelo ensaio *in vitro*, com apresentação de porcentagem de poços positivos em IFD e valores de quantificação viral por RT-qPCR após 72 hr de incubação considerados baixos. Em diversos ensaios prévios com amostras de suspensão viral inativada foram encontrados valores de IFD de no máximo 9% de positividade, sem grande variabilidade entre as repetições, sendo este considerado como valor de corte.

Entretanto as amostras 9 e 10 apresentaram alto índice de positividade no ensaio de recuperação viral combinado com quantificação viral elevada, com aumento de cerca de 1 log quando comparado às demais amostras.

As Figuras 20 e 21 trazem os achados nos ensaios realizados para a validação do método de vírus vivo residual *in vitro*. Na Figura 20 estão campos

relativos aos controles negativos, onde somente células BHK-21 foram incubadas com MCPI 2,5%, e positivos, com células BHK-21 inoculadas com vírus rábico de referência (PV). Na Figura 21 estão representadas amostras de SVI com resultados positivos e negativos no ensaio de vírus vivo residual *in vitro*.

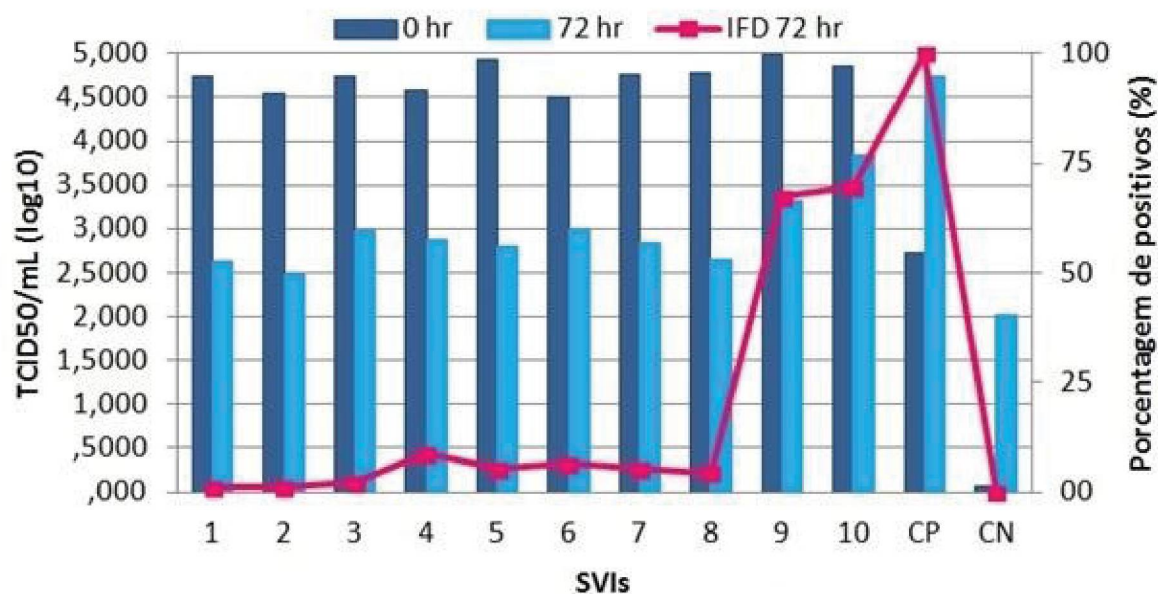
TABELA 9: VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*.

SVI	RABV 0hr				IFD % +	RABV 72hr			
	Cq	TCID50/mL	log10	ActB Cq		Cq	TCID50/mL	log10	ActB Cq
1	13,278	53.701,535	4,73	38,907	1,1	19,794	434,527	2,64	21,139
2	14,213	34.724,305	4,54	35,827	1,1	20,732	302,728	2,48	21,251
3	13,249	55.060,137	4,74	36,230	2,2	18,763	938,640	2,97	20,683
4	13,756	38.312,145	4,58	33,484	8,7	19,056	759,454	2,88	21,317
5	12,668	85.542,055	4,93	34,892	5,4	19,250	648,519	2,81	19,667
6	13,958	32.489,350	4,51	34,888	6,5	18,721	977,160	2,99	20,571
7	13,215	57.150,527	4,76	35,346	5,4	19,216	686,651	2,84	20,662
8	13,157	59.043,699	4,77	39,129	4,3	19,794	444,129	2,65	21,332
9	12,482	98.511,570	4,99	36,298	67,4	17,735	2.086,261	3,32*	26,119
10	12,900	71.143,242	4,85	33,811	69,6	16,044	6.942,910	3,84*	20,268
CP	20,005	543,993	2,74	32,563	100,0	13,518	55.192,457	4,74	28,801
CN	28,683	1,144	0,06	28,897	0,0	22,304	107,039	2,03	23,241

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: SVI, suspensão viral inativada; RABV, vírus rábico; Cq, ciclo de quantificação; TCID50, *tissue culture infective dose 50%*; IFD% +, porcentagem de poços positivos identificados por imunofluorescência direta; ActB, mRNA de Actina-B de células BHK-21.

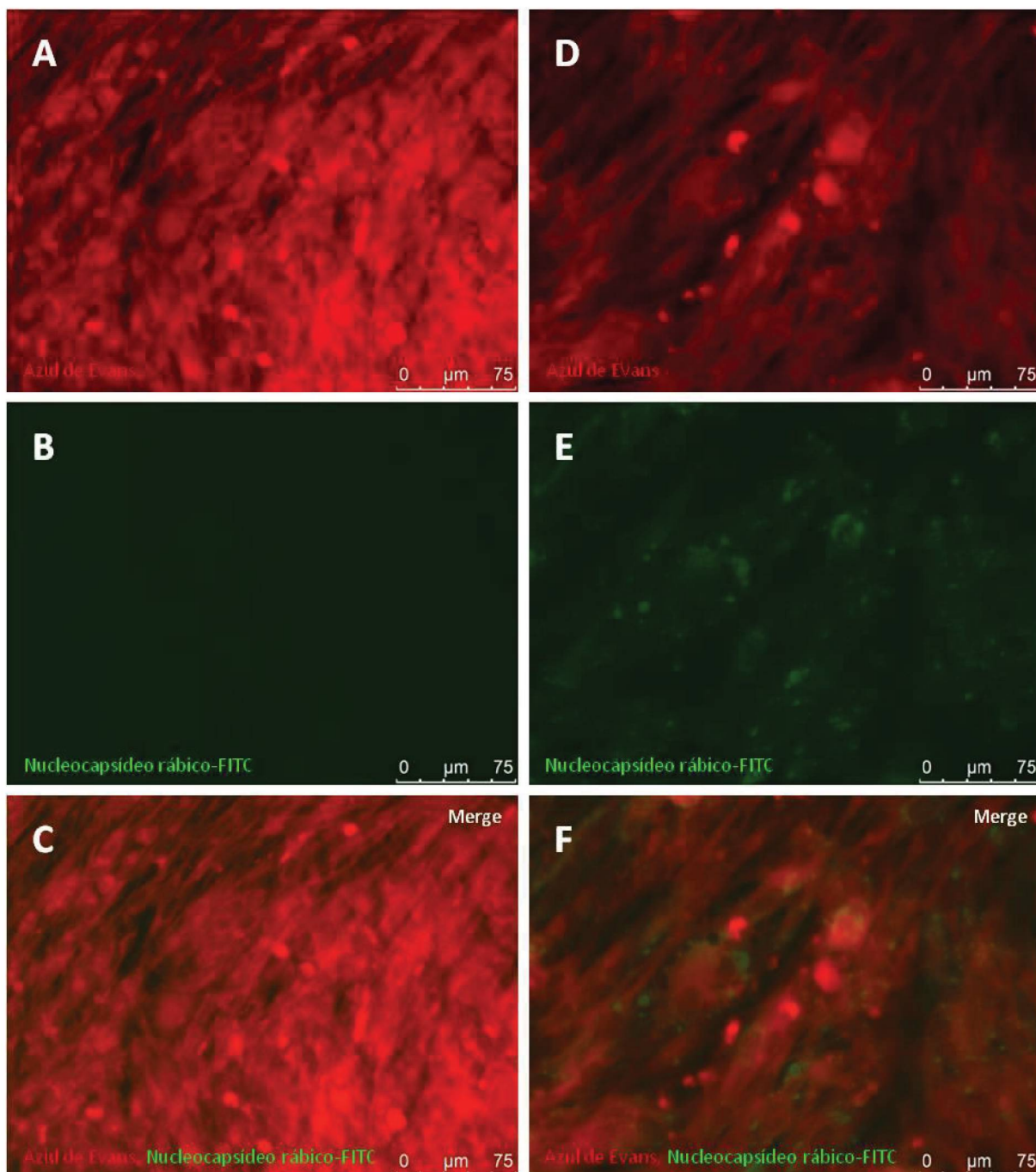
FIGURA 19: CULTIVO CELULAR E RT-qPCR – VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Porcentagem de poços positivos identificados por IFD (linha rosa), quantificação de RABV por RT-qPCR no tempo 0 hr (colunas azul escuro), quantificação de RABV por RT-qPCR no tempo 72 hr (colunas azul claro). SVIs, suspensão viral inativada; RABV, vírus rábico; Cq, ciclo de quantificação; TCID50, *tissue culture infective dose* 50%; IFD% +, porcentagem de poços positivos identificados por imunofluorescência direta; ActB, mRNA de Actina-B de células BHK-21.

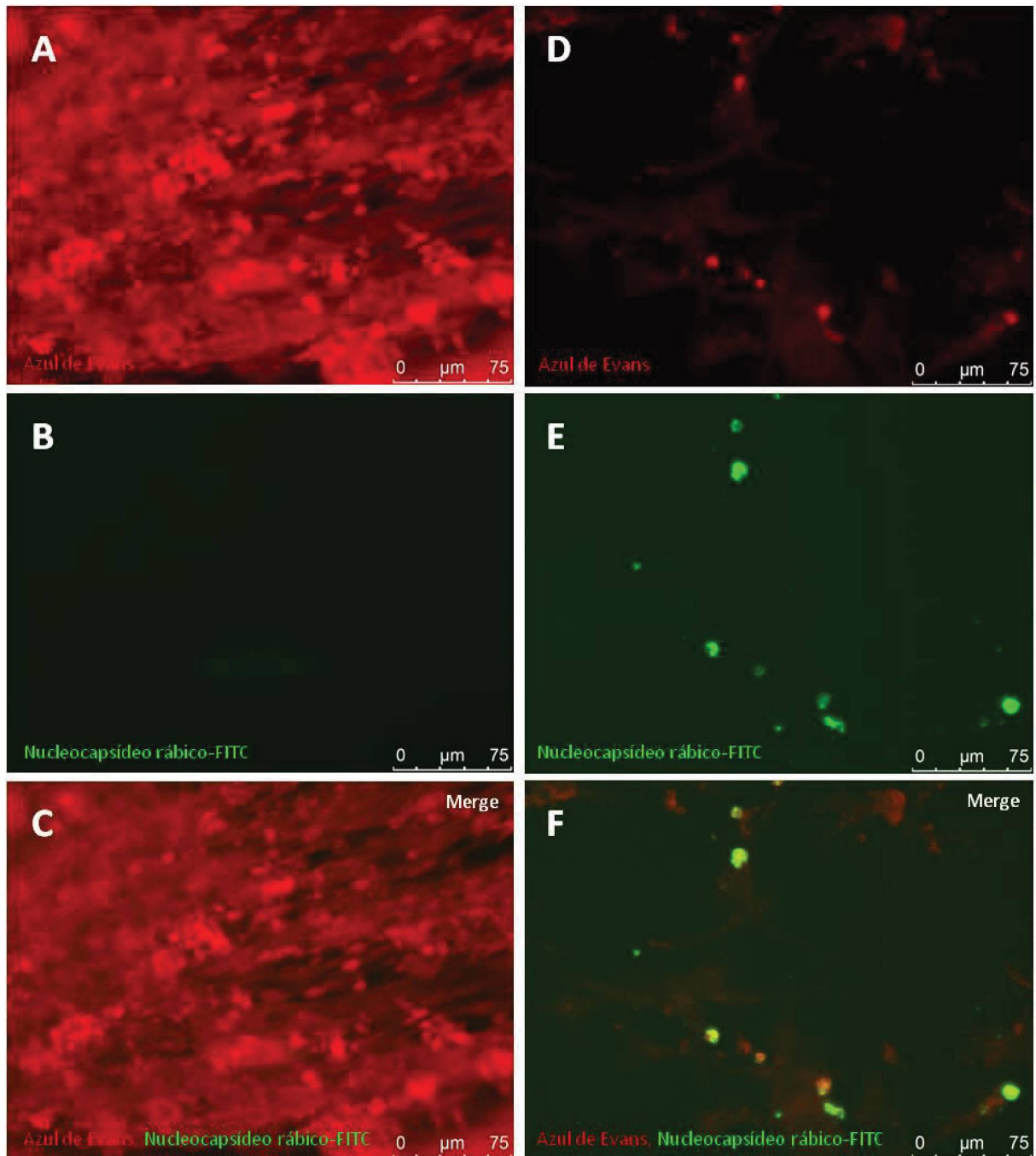
FIGURA 20: CULTIVO CELULAR DE VÍRUS RÁBICO – CONTROLES NEGATIVO E POSITIVO DO ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A, B e C: Controle negativo somente com células BHK-21; D, E e F: Controle positivo, células BHK-21 infectadas com RABV PV. Aumento de 40x, Microscópio óptico de fluorescência, ICC – Curitiba, PR.

FIGURA 21: CULTIVO CELULAR DE VÍRUS RÁBICO – AMOSTRAS DE SUSPENSÃO VIRAL INATIVADA DE ENSAIO DE VÍRUS VIVO RESIDUAL *IN VITRO*.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A, B e C: Amostra SVI negativa em ensaio de inativação viral *in vitro*; D, E e F: Amostra SVI positiva em ensaio de inativação viral *in vitro*. Aumento de 40x, Microscópio óptico de fluorescência, ICC – Curitiba, PR.

6.8. IDENTIFICAÇÃO VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO CULTIVO CELULAR

Com a obtenção de resultados positivos em determinadas amostras de SVI durante a validação do ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, fez-se a necessidade da confirmação desses resultados. Para tanto, amostras de SVI com resultados negativo e positivo pelo ensaio de vírus vivo residual *in vitro* acima, identificadas como SVI- e SVI+, foram processadas como descrito no item 5.13.

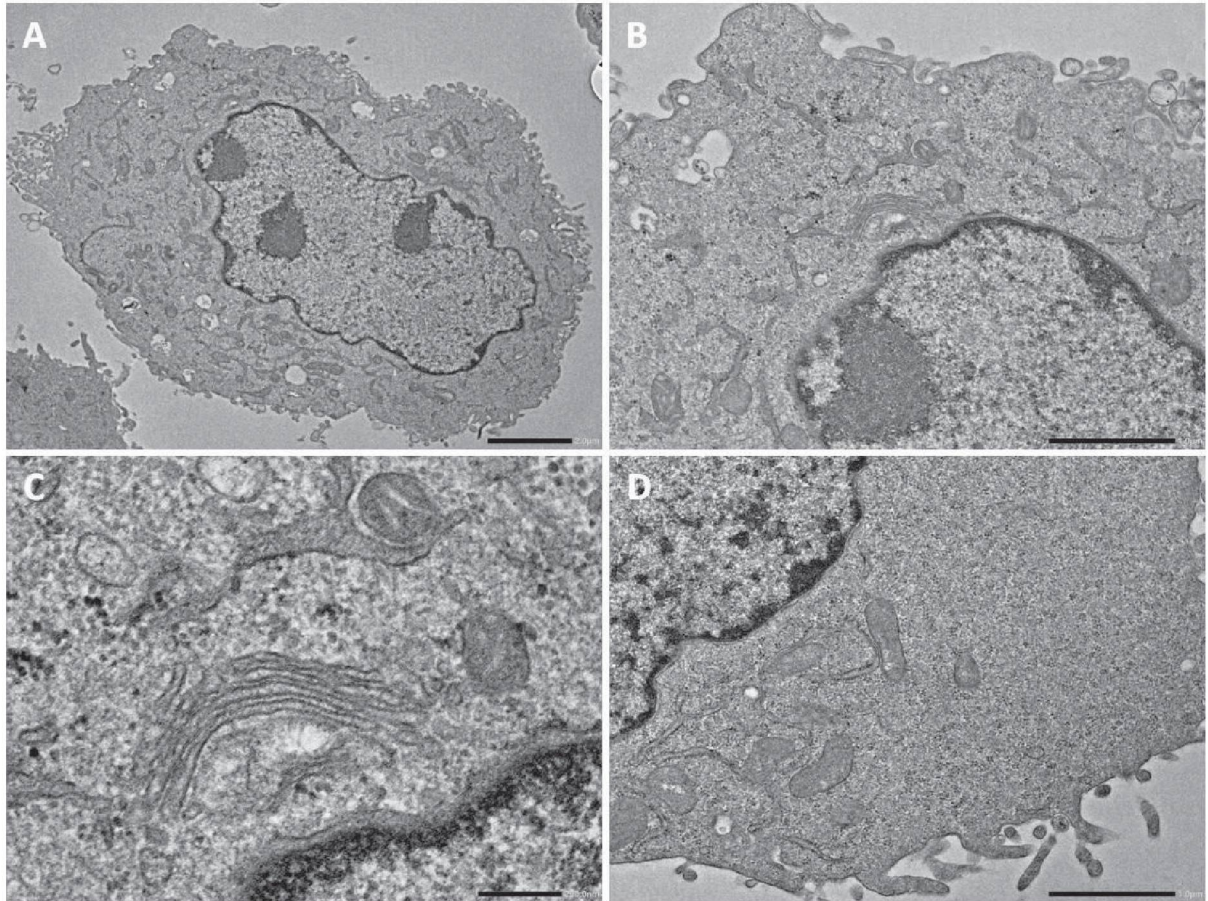
As Figuras 22, 23, 24 e 25 são resultantes destas análises. A Figura 22 traz imagens do controle negativo, onde células BHK-21 foram incubadas somente com MCPI 2,5%, onde se pode observar células regulares, com organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi.

Na Figura 23, referente ao controle positivo do ensaio, onde células BHK-21 foram inoculadas com vírus rábico de referência (PV) e incubadas com MCIP 2,5%, podem ser observadas células irregulares, organelas normais, porém com partículas virais compatíveis com o vírus da raiva (XU et al., 2015). Pode-se observar partículas virais fora do citoplasma (23- B e C), em processo de brotamento da célula (23- D), assim como grandes acúmulos intracitoplasmáticos (23- E e F).

Células BHK-21 inoculadas com amostra de produto intermediário que obteve resultado negativo no ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, SVI-, estão representadas na Figura 24, onde temos células comparáveis às obtidas pelo controle negativo, sem a presença visível de partículas virais.

Por fim, a Figura 25 mostra células BHK-21 inoculadas com amostras de SVI que tiveram resultado positivo durante os testes de validação do ensaio de vírus vivo residual *in vivo*, SVI+. Pode-se observar células irregulares, com partículas intracelulares exclusivas (25- E) não comparáveis com o vírus rábico obtido no controle positivo (Figura 23).

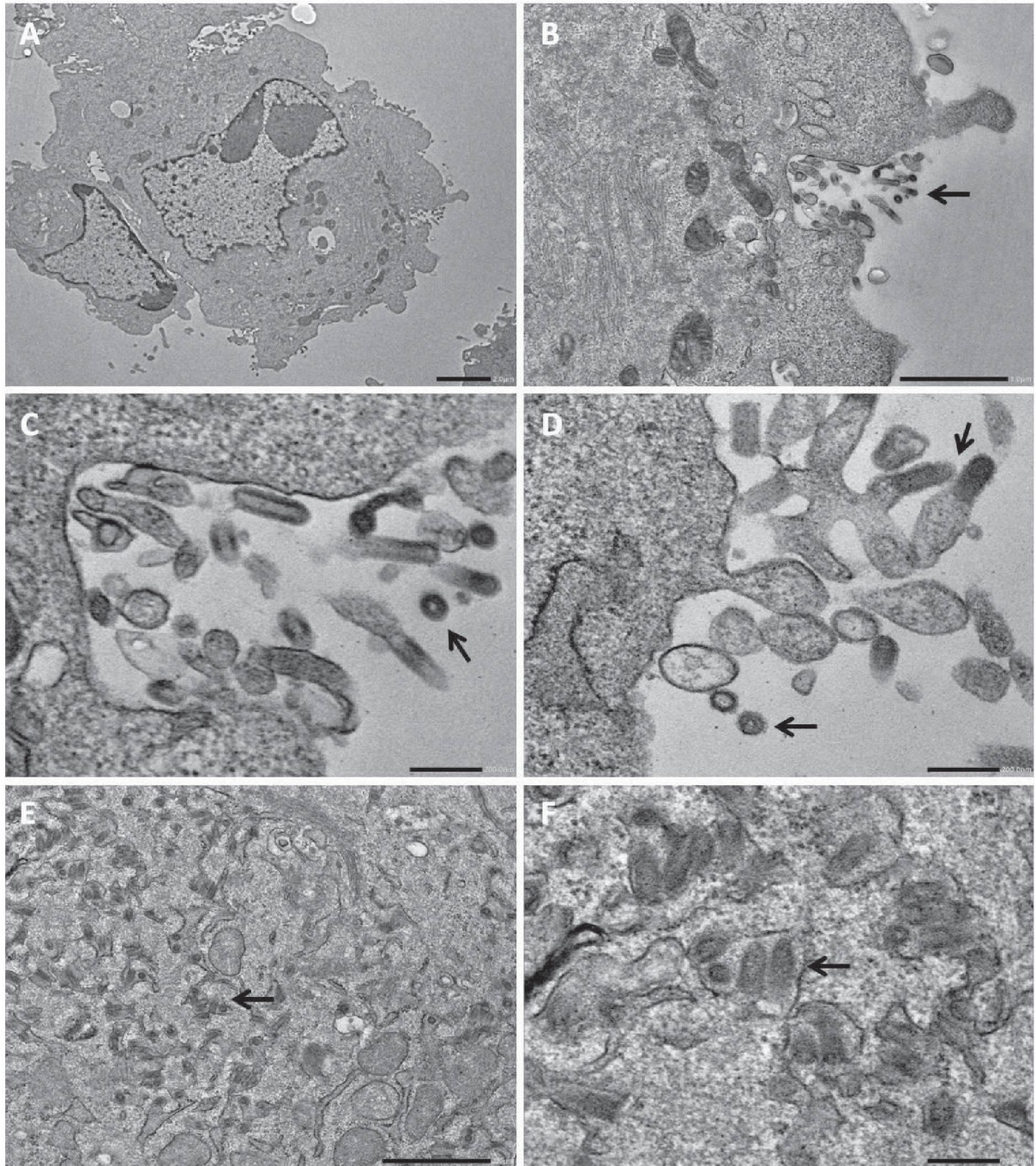
FIGURA 22: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 –
CONTROLE NEGATIVO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Células BHK-21 cultivadas em MCPI 2,5%, 37°C, 72 horas. A- 2 μm, B- 1 μm, C- 200 nm, D- 1 μm.

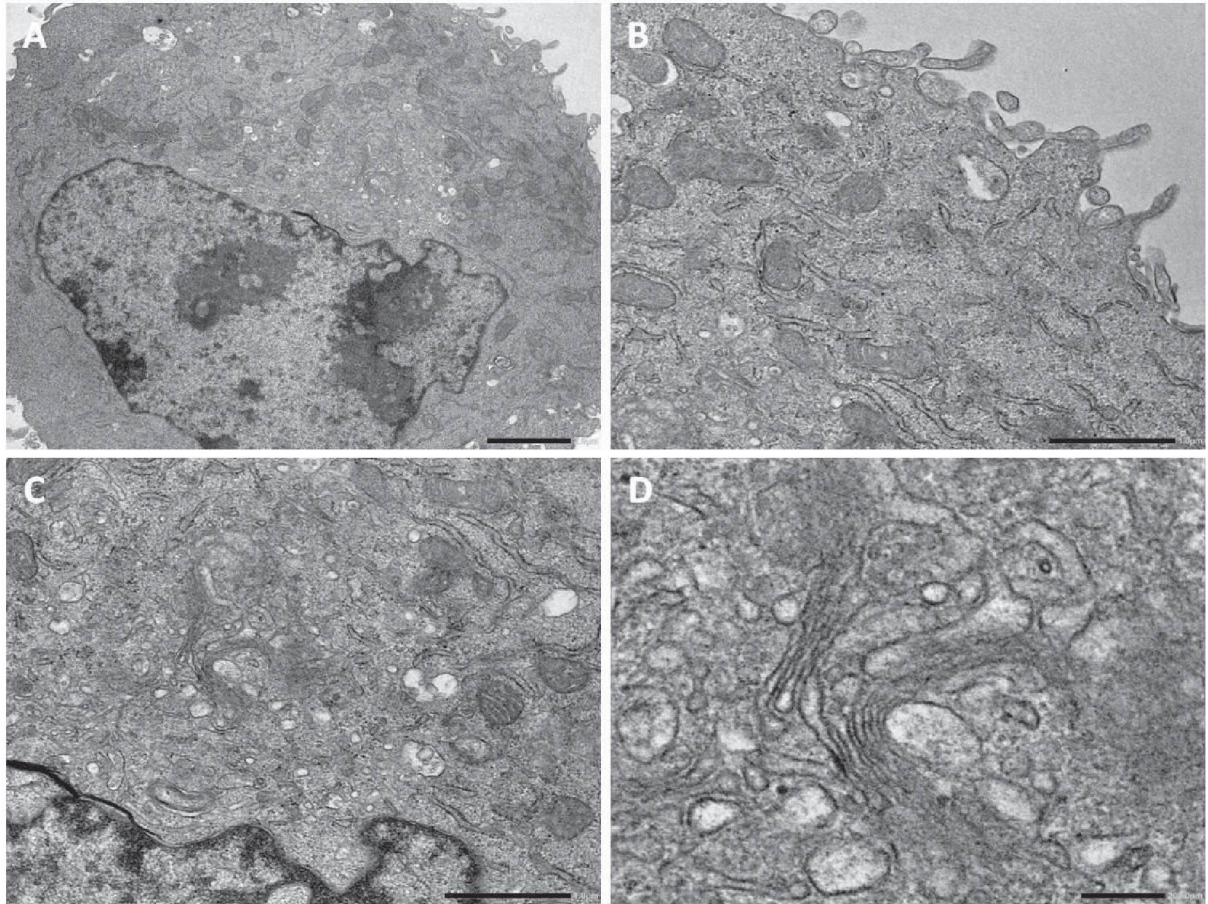
FIGURA 23: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 –
CONTROLE POSITIVO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Células BHK-21 inoculadas com RABV de referência (PV), cultivadas em MCPI 2,5%, 37°C, 72 horas. A- 2 μ m, B- (ponta da seta) 1 μ m, C- (ponta da seta) 200 nm, D- (ponta da seta) 200 nm, E- (ponta da seta) 1 μ m, F- (ponta da seta) 200 nm.

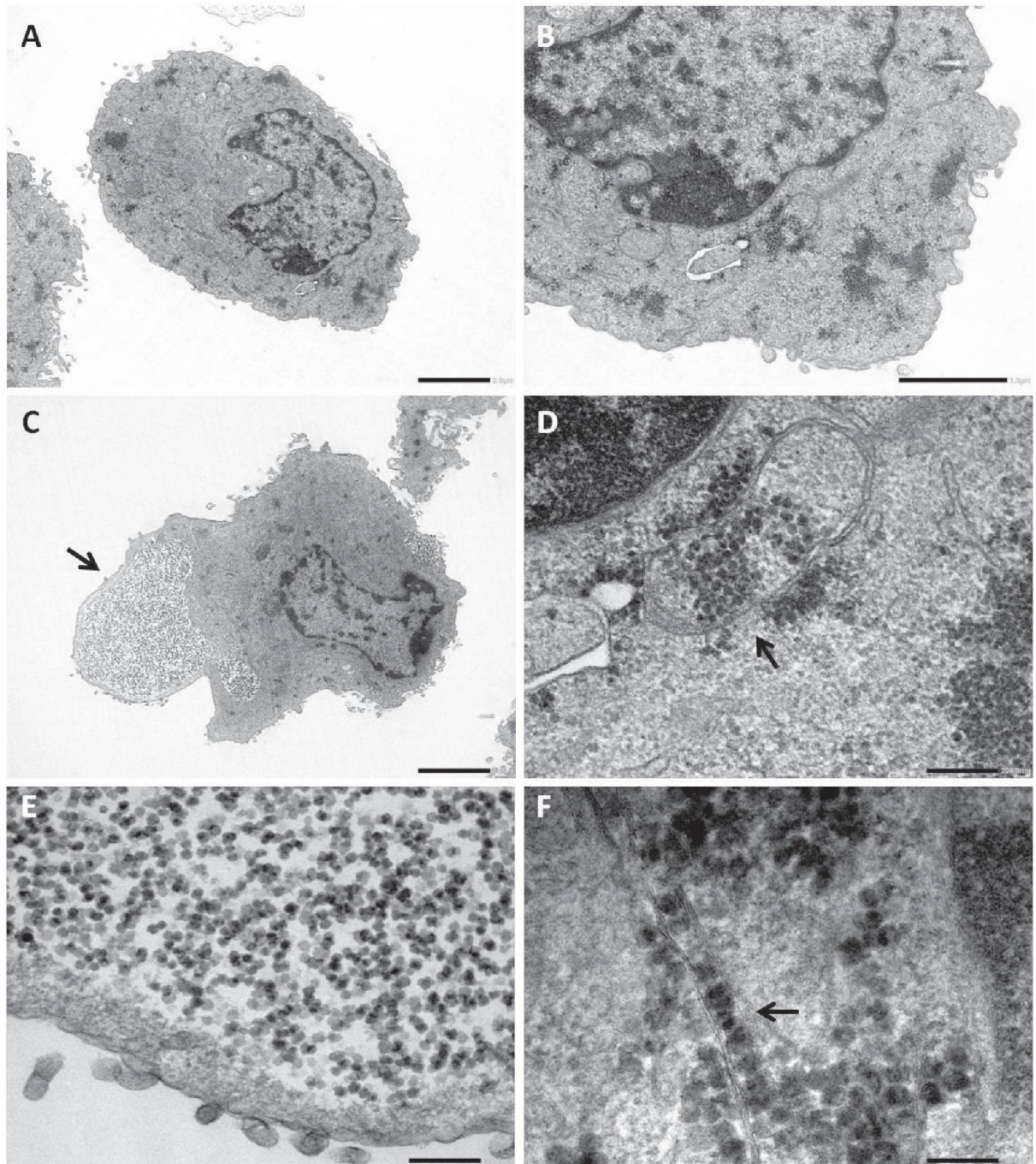
FIGURA 24: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – AMOSTRA SVI-.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Células BHK-21 inoculadas com SVI -, cultivadas em MCPI 2,5%, 37°C, 72 horas. A- 2 μ m, B- 1 μ m, C- 1 μ m, D- 200 nm.

FIGURA 25: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS BHK-21 – AMOSTRA SVI+.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Células BHK-21 inoculadas com SVI +, cultivadas em MCPI 2,5%, 37°C, 72 horas. A- 2 μm, B- 1 μm, C- (ponta da seta) 2 μm, D- (ponta da seta) 200 nm, E- 200 nm, F- (ponta da seta) 100 nm.

6.9. ENSAIO *IN VIVO* PARA CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE VIRAL

6.9.1. Ensaio *in vivo*

Após realizadas as análises em MET, amostras dos sobrenadantes das culturas dos SVI+ e SVI- foram coletadas e realizados ensaio de vírus vivo residual *in vivo*, conforme descrito no item 5.7, para a análise de infectividade das partículas observadas no MET.

Os animais inoculados com amostra de sobrenadante de cultivo celular inoculado com SVI- não apresentaram nenhum sintoma específico de raiva durante todo o período de observação do ensaio, como pode-se ver na Figura 26-A onde todos os animais da caixa estão com aparência saudável após os 21 dias de ensaio. Somente 1 dos 56 animais utilizados neste ensaio não sobreviveu, porém não foi evidenciada doença no mesmo.

Entretanto, os animais inoculados com amostra de sobrenadante de cultivo celular inoculado com SVI+ desenvolveram sintomas característicos de infecção por vírus rábico já no quinto dia após a inoculação, que podem ser classificados em estágio 1 (pelo eriçado e corpo encurvado), 2 (movimentos lentos e isolamento), 3 (tremores e convulsões) e 4 (paralisia) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014a), como exemplificado na Figura 26-B, onde pode-se ver animais com características de sofrimento, como encolhimento, pelo eriçado e membros inferiores paralisados. Todos os 56 animais participantes deste ensaio foram eutanasiados quando do aparecimento de sintomas específicos, para minimizar o sofrimento.

FIGURA 26: ENSAIO *IN VIVO* DA ATIVIDADE VIRAL – COMPARAÇÃO DE CAMUNDONGOS.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A- Camundongos inoculados com amostra SVI-, 21º dia após a inoculação;
B- Camundongos inoculados com amostra SVI+, 5º dia após a inoculação.

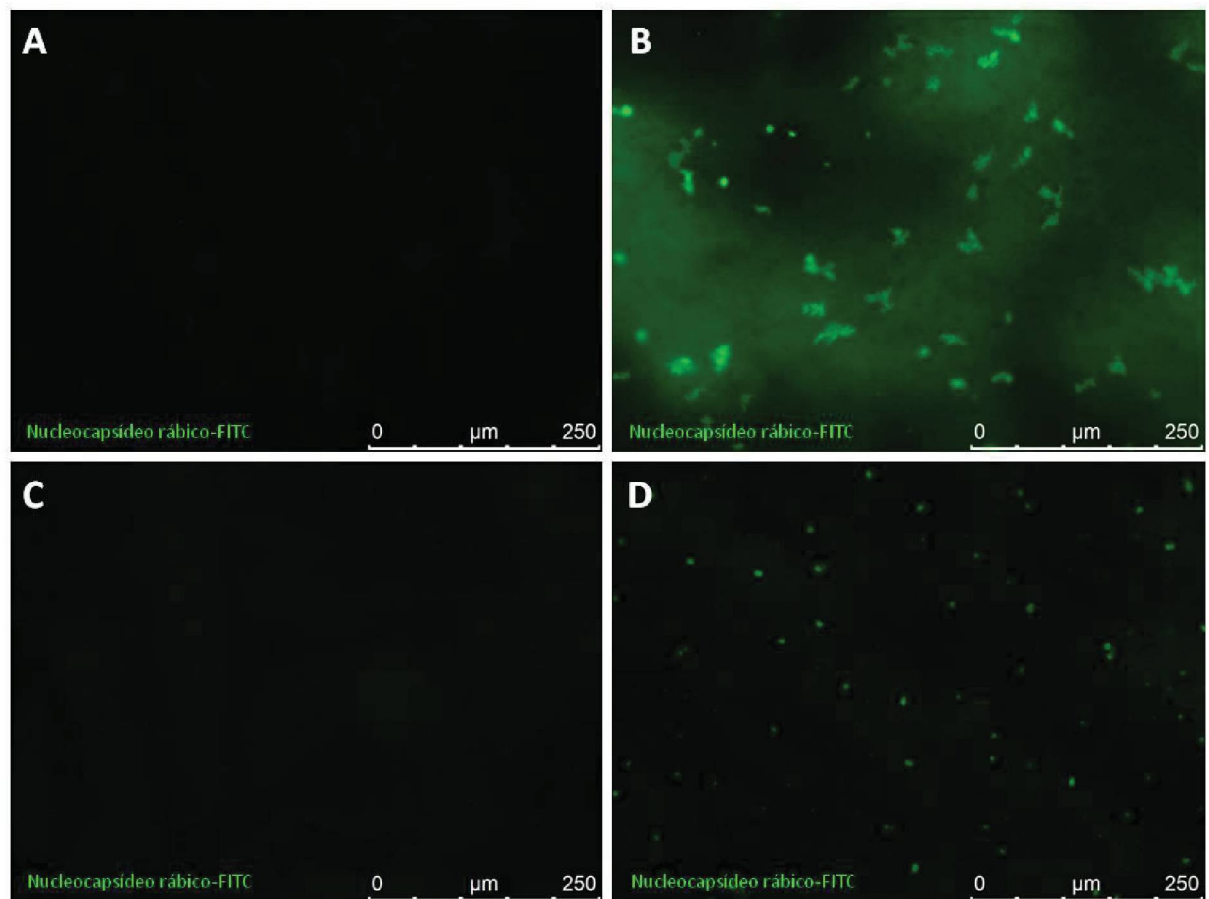
6.9.2. Teste de imunofluorescência direta para confirmação da infectividade viral

Para a confirmação de morte por raiva, foi realizado o ensaio de TIFD, conforme descrito no item 5.14, em um camundongo saudável não inoculado (controle negativo), um inoculado com vírus rábico de referência – PV eutanasiado logo após o aparecimento dos primeiros sintomas de doença (controle positivo), um animal inoculado com amostra de sobrenadante de cultivo celular inoculado com SVI+, também eutanasiado após o surgimento dos primeiros sintomas de doença, e um inoculado com amostra de sobrenadante de cultivo celular inoculado com SVI- eutanasiado após o término dos 21 dias de observação e que não apresentou nenhum sintoma característico de raiva.

A Figura 27 traz os resultados obtidos do ensaio de TIFD das 4 amostras relatadas acima. Pode-se observar que os controles negativo e positivo estão condizentes com os controles internos do ensaio, que o animal inoculado com amostra SVI- apresenta resultado negativo para infecção com vírus rábico e que o

camundongo inoculado com amostra SVI+ apresenta resultado positivo para infecção por raiva. A diferença de positividade entre o controle positivo e a amostra SVI+ pode ser explicada pelo fato de que o animal utilizado como controle positivo foi inoculado com vírus rábico de trabalho, o vírus PV que é o utilizado como referência para ensaios de controle de qualidade, portanto o alta intensidade de fluorescência na IFD. O padrão mais fraco de fluorescência apresentado na amostra de animal inoculado com SVI+ possivelmente é devido ao vírus vacinal utilizado no preparo da amostra.

FIGURA 27: TESTE DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA COM AMOSTRAS SVI- E SVI+.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A- Controle negativo; B- Controle positivo; C- Camundongo inoculado com amostra SVI- ; D- Camundongo inoculado com amostra SVI+.

6.9.3. Análise por microscopia eletrônica de transmissão das amostras biológicas

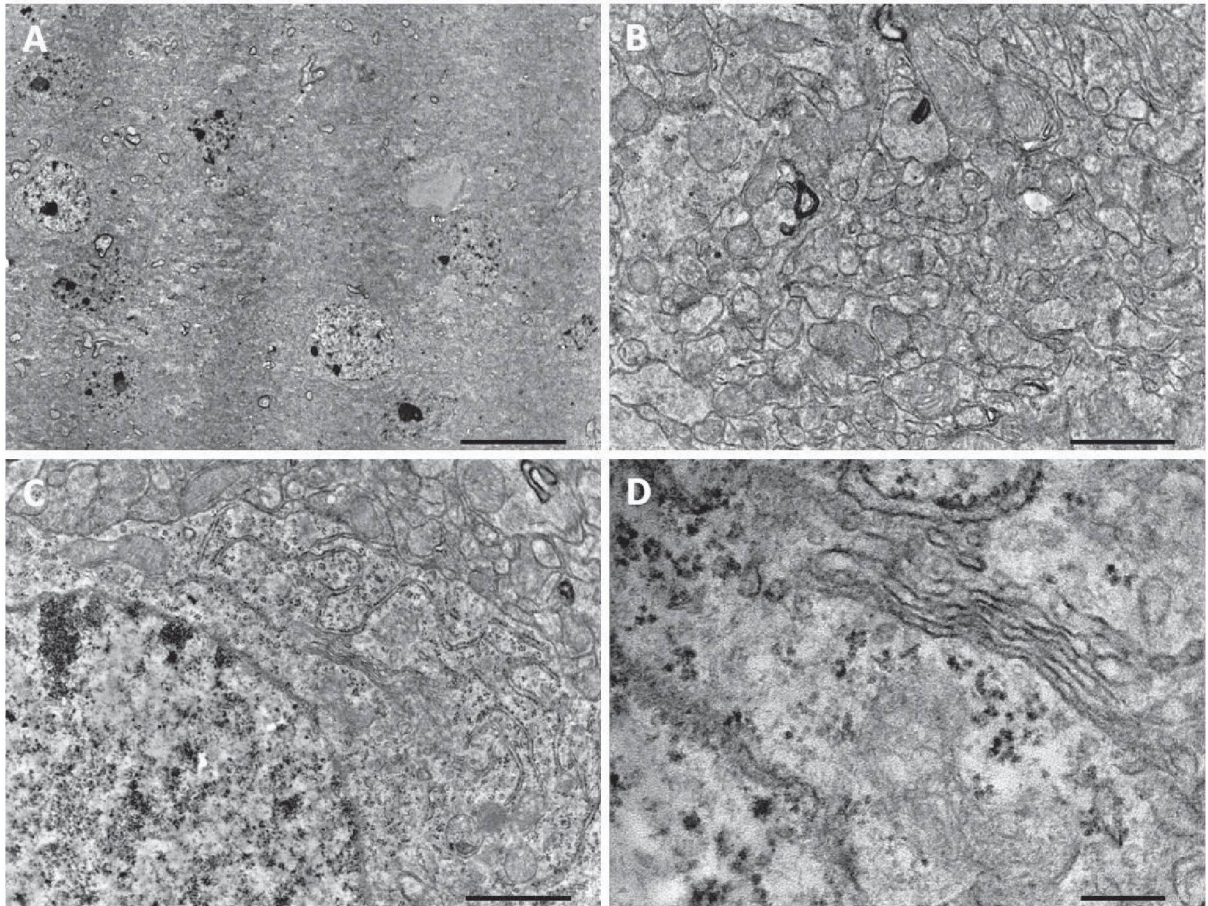
As mesmas amostras biológicas coletadas para a realização da confirmação de infecção por vírus rábico por TIFD foram utilizadas para a análise por MET. As Figuras 28, 29, 30 e 31 trazem os resultados destas análises.

A Figura 28 traz imagens do controle negativo, em que pode ser observado o tecido cerebral sadio do animal não inoculado. Já a Figura 29, referente ao controle positivo do ensaio, em que um camundongo foi inoculado com vírus rábico de referência (PV) e eutanasiado após o aparecimento de sintomas característicos de raiva, pode ser observado o tecido cerebral bem mais desestruturado (Figura 29-A e B), com a presença de partículas virais compatíveis com o vírus da raiva (Figura 29-C e D) (XU et al., 2015).

O tecido cerebral de um camundongo inoculado com amostra de produto intermediário que obteve resultado negativo no ensaio de inativação viral *in vitro*, SVI-, está representado na Figura 30, em que temos tecido comparável ao obtido pelo controle negativo, sem a presença visível de partículas virais.

Já a Figura 31 mostra o tecido cerebral de um animal inoculado com amostra de SVI que teve resultado positivo durante os testes de validação do ensaio de inativação viral *in vivo*, SVI+. Pode-se observar tecido irregular e danificado (Figura 31-A e B), com presença de grande quantidade de partículas virais (Figura 31-C e D), comparáveis com o vírus rábico obtido no controle positivo (Figura 29).

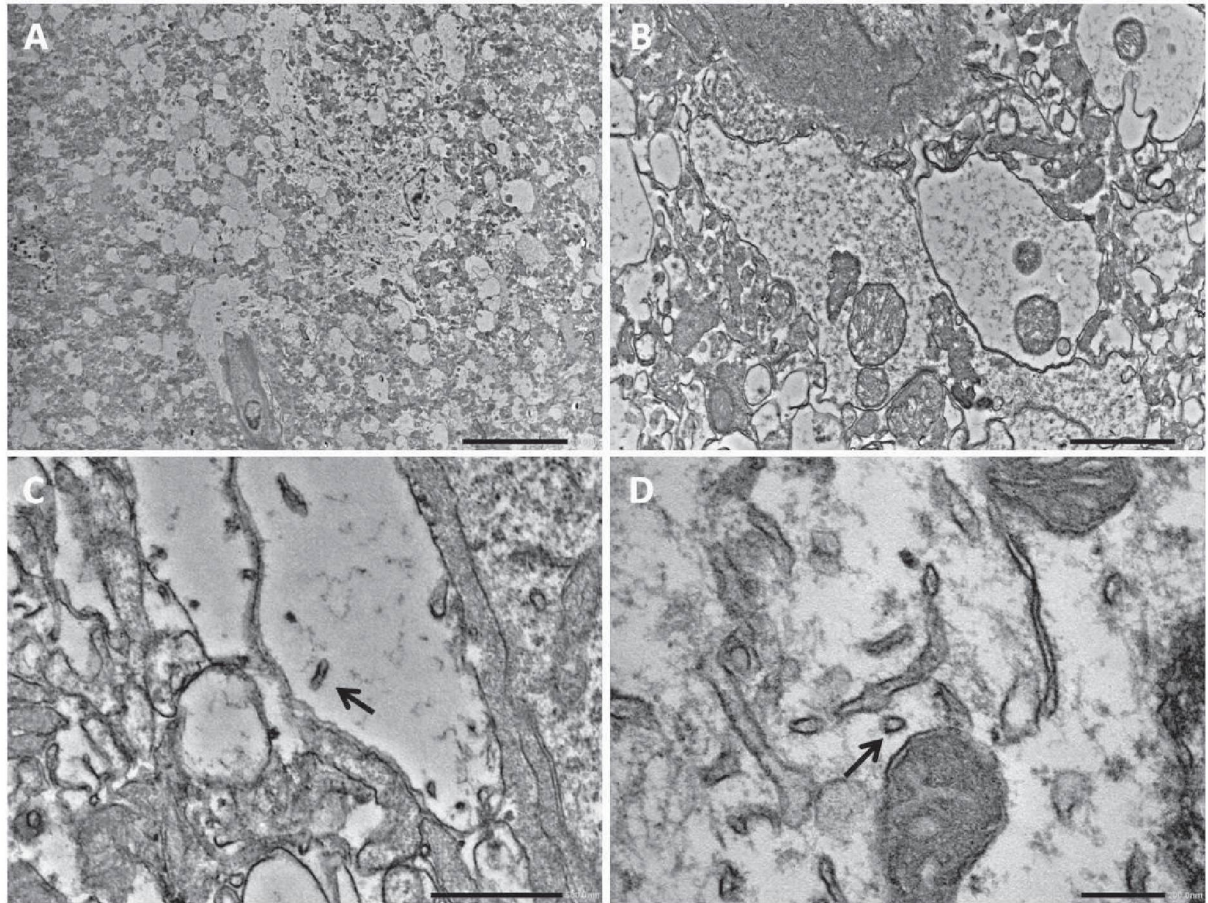
FIGURA 28: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – CONTROLE NEGATIVO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Tecido cerebral de camundongos saudáveis não inoculados. A- 10 μm , B- 1 μm , C- 1 μm , D- 200 nm.

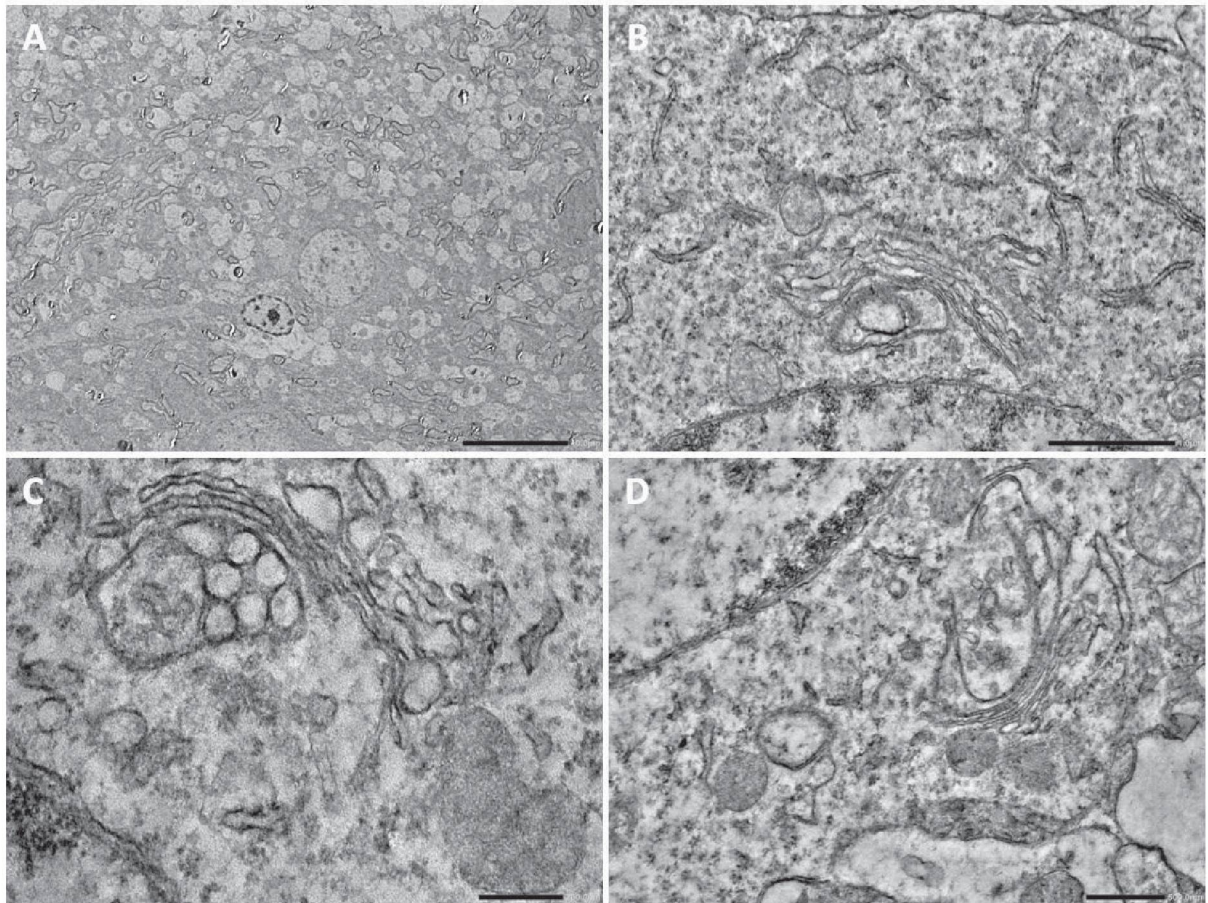
FIGURA 29: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – CONTROLE POSITIVO.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Tecido cerebral de camundongos inoculados com vírus rábico de referência – PV. A- 10 μ m, B- 1 μ m, C- partícula viral (ponta da seta), 500 nm, D- flecha: partícula viral (ponta da seta), 200 nm.

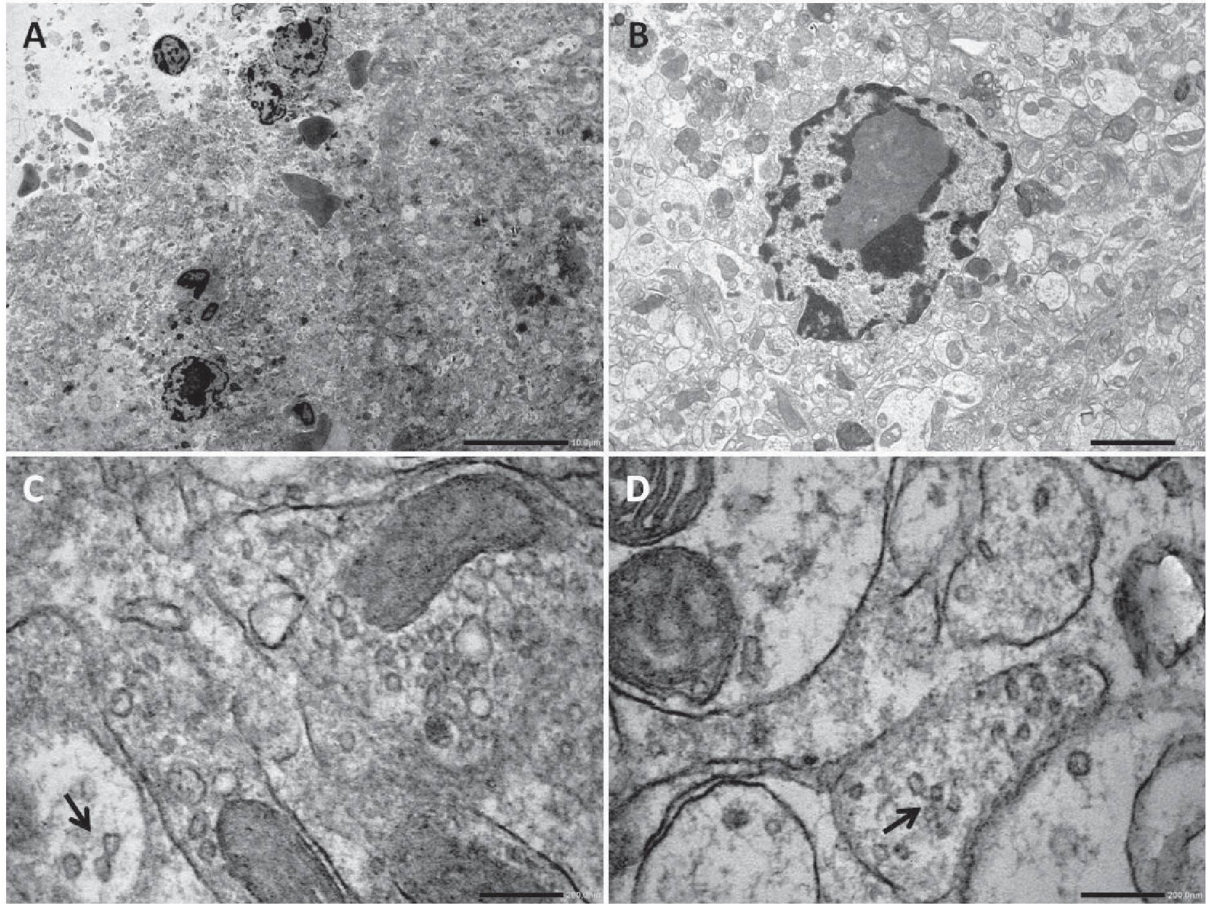
FIGURA 30: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – AMOSTRA SVI–.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Tecido cerebral de camundongo inoculado com amostra SVI–. A- 10 µm, B- 1 µm, C- 200 nm, D- 500 nm.

FIGURA 31: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO CEREBRAL DE CAMUNDONGOS – AMOSTRA SVI+.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Tecido cerebral de camundongo inoculado com amostra SVI+. A- 10 µm, B- 2 µm, C- partícula viral (ponta da seta), 200 nm, D- partícula viral (ponta da seta), 200 nm.

6.9.4. Análise por histologia das amostras biológicas

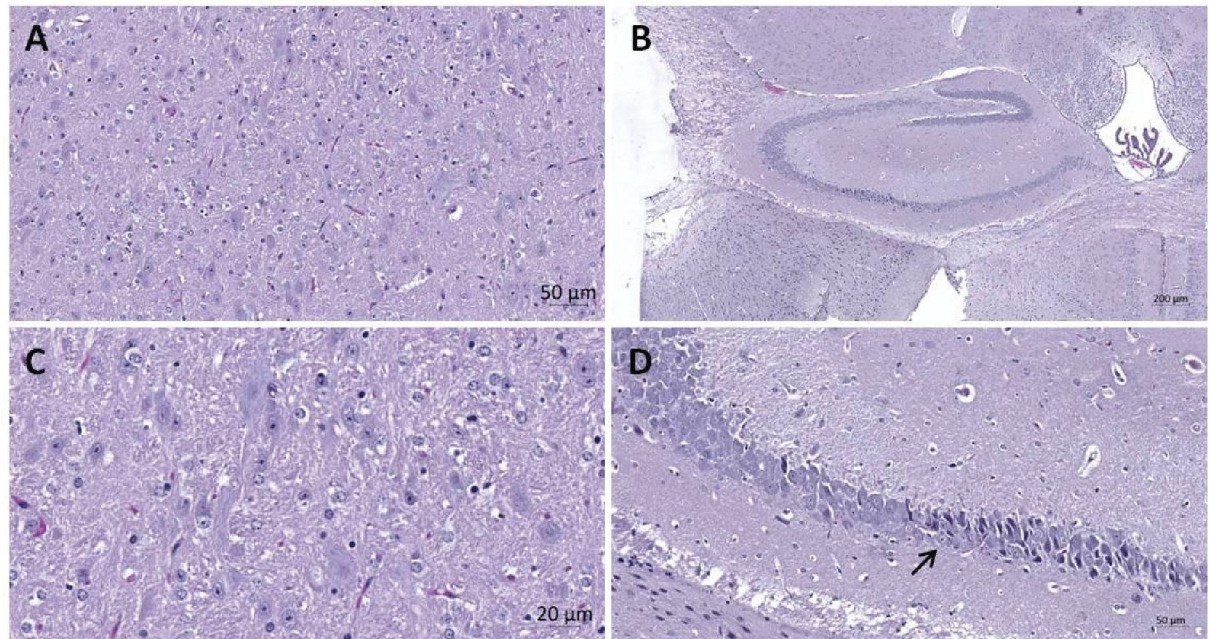
Os achados das análises histopatológicas do sistema nervoso central (cérebro e cerebelo) de animais do ensaio *in vivo* estão expostos nas Figuras 32, 33, 34 e 35.

No encéfalo do animal saudável não inoculado, utilizado como controle negativo, pode-se observar celularidade normal, com hipocampo e gânglios de base de aspecto habitual (Figura 32-A, B e C). Entretanto, são observados no hipocampo alguns poucos neurônios vermelhos/necróticos (indicando morte celular ou lesão celular irreversível) na secção CA2, possivelmente resultado da hipóxia sofrida pelo animal no momento da eutanásia por CO₂ (Figura 32-D).

A análise do tecido neural do camundongo inoculado com vírus rábico de referência PV (controle positivo do ensaio), revelou tronco cerebral com aumento de celularidade e edema, presença de meningite (Figura 33-C), encefalite perivascular, nódulos microgliais e neurônios vermelhos (Figura 33-D), e corpúsculos de Negri em células de Purkinje no cerebelo do animal (Figura 33-B).

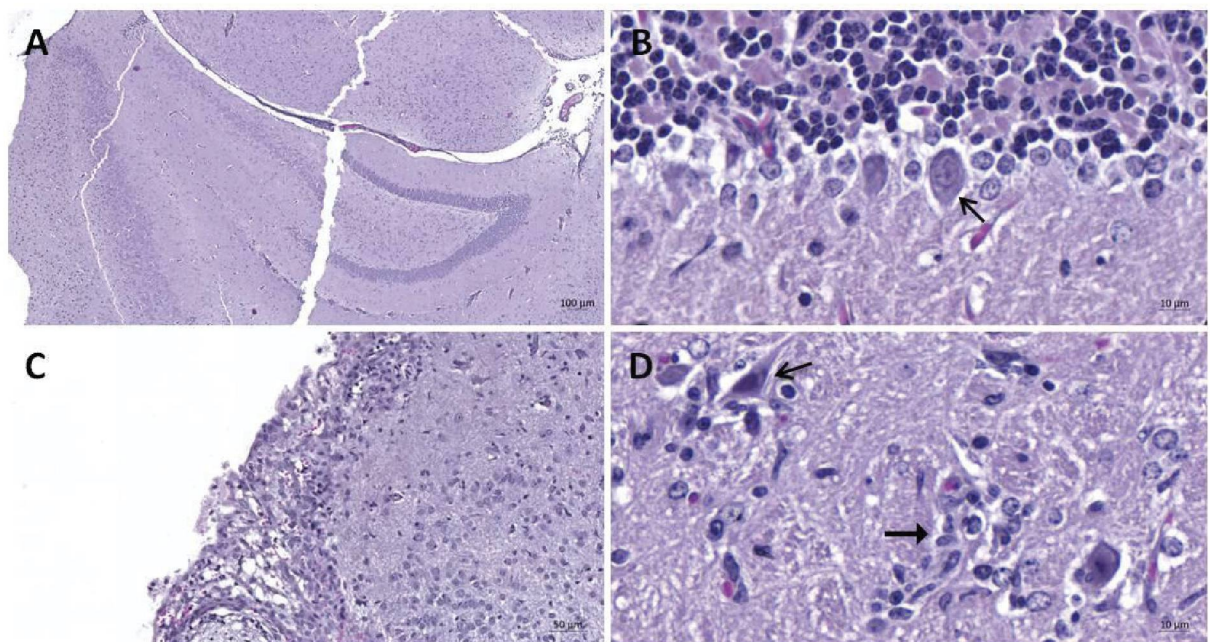
O animal inoculado com amostra de produto intermediário que obteve resultado negativo no ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, SVI-, está representado na Figura 34. O cérebro deste animal apresentou-se normal na análise histopatológica, semelhante ao controle negativo, sem lesão aparente, apenas com cerebrite discreta que pode ser explicada pela inoculação de material estranho e raros neurônios vermelhos no hipocampo, possivelmente devido à eutanásia por CO₂.

Já os animais inoculados com amostra de produto intermediário que obteve resultado positivo no ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, SVI+, representados na Figura 35, apresentaram lesão cerebral mais pronunciada se comparados ao controle positivo. Os gânglios de base apresentaram celularidade consideravelmente aumentada, com presença de edema acentuado (Figura 35-A), numerosos neurônios vermelhos e astrócitos reativos (Figura 35-B), encefalite perivascular (Figura 35-E) e meningite. Também foi possível identificar corpúsculos de Negri em células de Purkinje destes animais (Figura 35-F). Nas células do hipocampo, foi possível identificar lesão celular acentuada na secção CA3 (Figuras 35-B e D).

FIGURA 32: HISTOLOGIA DE CAMUNDONGO CONTROLE NEGATIVO DO ENSAIO *IN VIVO*.

FONTE: O autor (2019).

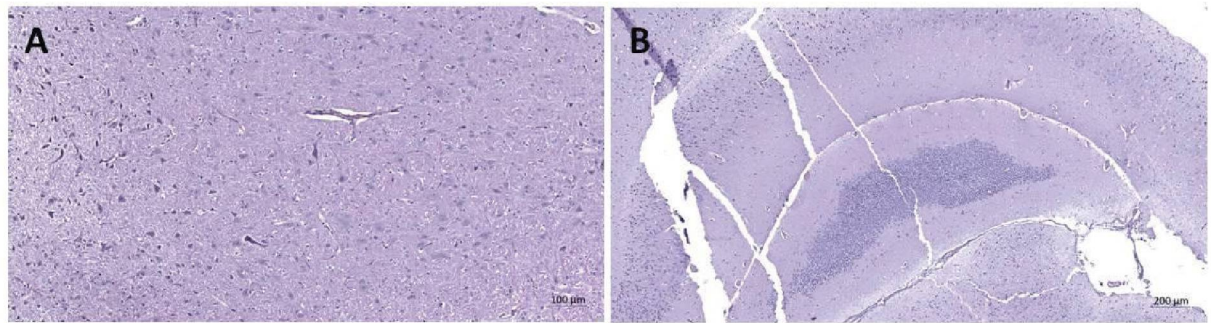
LEGENDA: A- gânglios de base com celularidade normal (100x); B- hipocampo normal (25x); C- gânglios de base com celularidade normal (200x); D- hipocampo com presença de neurônios vermelhos (ponta da seta) (100x).

FIGURA 33: HISTOLOGIA DE CAMUNDONGO CONTROLE POSITIVO DO ENSAIO *IN VIVO*.

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A- hipocampo normal (25x); B- célula de Purkinje com corpúsculo de Negri (ponta da seta) (400x); C- cerebelo com meningite (200x); D- nódulos microgliais com presença de neurônio vermelho (ponta da seta fina) e após a degradação do neurônio infectado (ponta da seta grossa). (400x).

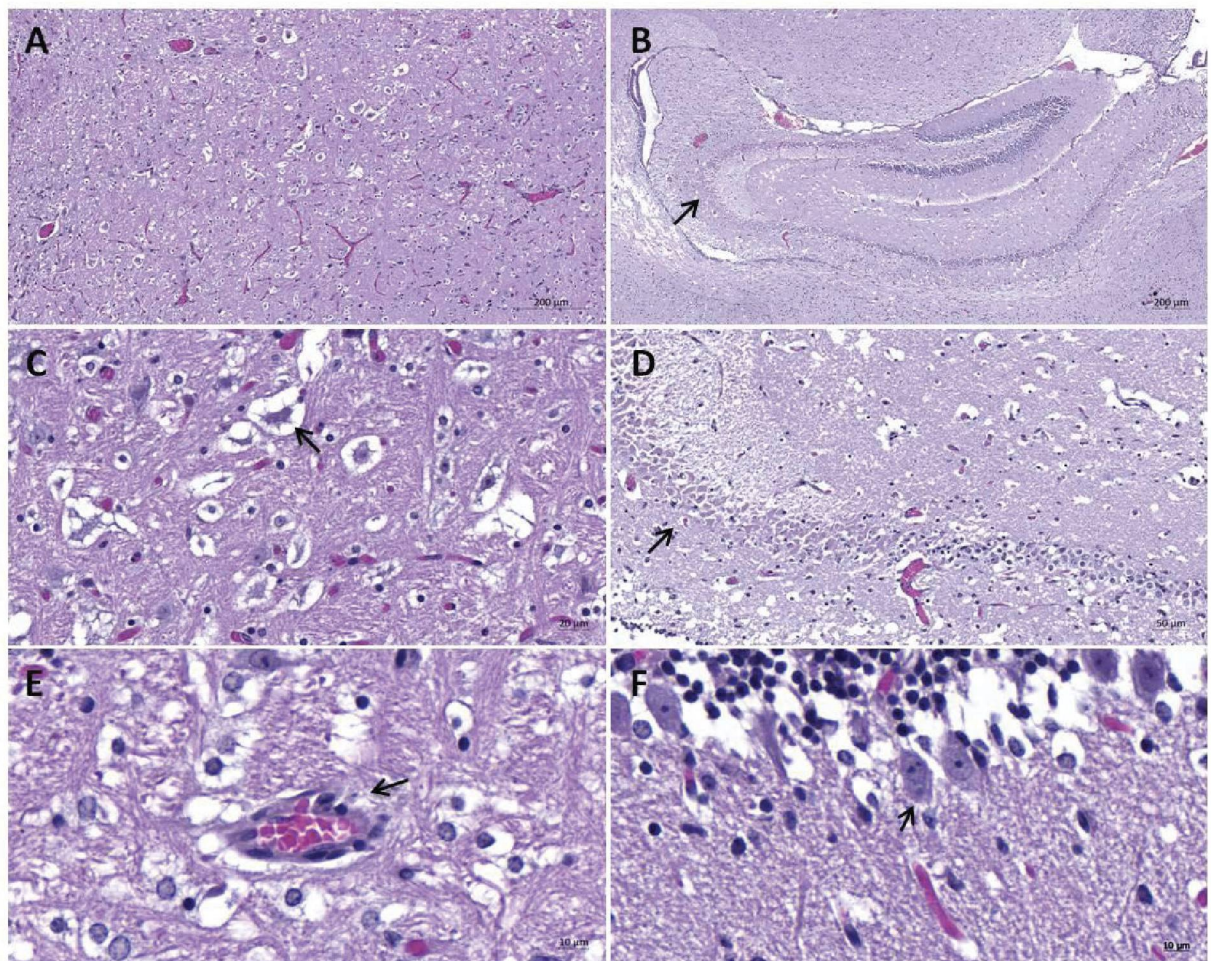
FIGURA 34: HISTOLOGIA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRAS DE SVI- DO ENSAIO *IN VIVO*.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A- gânglios de base com celularidade normal (50x); B- hipocampo normal (25x).

FIGURA 35: HISTOLOGIA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRAS DE SVI+ DO ENSAIO *IN VIVO*.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: A- gânglios de base com edema cerebral (50x); B- hipocampo com lesão neuronal (ponta da seta) (25x); C- gânglios de base com edema cerebral e neurônios vermelhos (ponta da seta) (200x); D- hipocampo com lesão neuronal (ponta da seta) (100x); E- encefalite perivascular (400x); F- célula de Purkinje com corpúsculo de Negri (ponta da seta) (400x).

7. DISCUSSÃO

Apesar de esforços mundiais para reduzir o número de animais de laboratório utilizados em ensaios, o refinamento das condições de métodos *in vivo* e até a substituição por metodologias equivalentes *in vitro* para ensaios de controle de qualidade necessários para assegurar a segurança e eficácia de vacina antirrábicas, pouco se evoluiu com relação à aplicação do conceito dos 3Rs no ensaio de determinação da inativação viral (STOKES et al., 2012). O desenvolvimento e validação de um ensaio *in vitro* rápido e de fácil realização permanece uma necessidade para reduzir a grande quantidade de animais de laboratórios, especialmente camundongos, exigidos para o ensaio de vírus vivo residual obrigatório para a liberação de todos os lotes de vacina antirrábica inativada veterinária produzidos mundialmente (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014a). Para vacinas de uso humano, a Farmacopeia Europeia traz um método *in vitro* para a determinação de vírus residual infeccioso, onde pelo menos 25 doses de vacina devem ser inoculados em linhagem celulares sensíveis ao vírus rábico e incubadas por 21 dias para então realizar a IFD (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b).

Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio para a detecção de vírus rábico residual viável em vacina antirrábica inativada veterinária e seu uso validado de maneira inicial em uma indústria produtora deste tipo de vacina. O ensaio consiste na recuperação viral em cultivo celular e posterior quantificação viral por RT-qPCR.

A primeira parte do presente trabalho foi a padronização do ensaio de recuperação viral em cultivo celular. Várias linhagens celulares são utilizadas em ensaios envolvendo o vírus rábico, como a Neuroblastoma 2A, Vero, BHK-21, entre outras, principalmente de origem neural. Estas linhagens apresentam diferenças em relação às características de cultivo e sensibilidade à infecção por diferentes cepas de RABV, sendo a Neuro-2a descrita usualmente como a ideal para ensaios envolvendo este vírus (INOUE et al., 2003; TAKAYAMA-ITO et al., 2014). Entretanto a linhagem BHK-21 é amplamente utilizada para isolamento, cultivo e diagnóstico de RABV por ser um tipo celular de fácil manutenção e altamente sensível à sua infecção viral (CLIQUET; AUBERT; SAGNÉ, 1998; KANITZ et al., 2015; KRÄMER et al., 2013; MEHTA, 2017). Levando em consideração as vantagens apresentadas por esta linhagem e o fato de que guias internacionais de boas práticas em controle de qualidade recomendam que ensaios de controle de qualidade de vacinas virais

produzidas em cultivo celular sejam realizados com as mesmas linhagens utilizadas para a sua produção, a linhagem celular BHK-21 foi a escolhida para o ensaio de recuperação viral desenvolvido neste trabalho (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b; OIE, 2013; WHO, 2019).

Para se obter a máxima taxa de recuperação viral, as condições de cultivo celular, como concentração de inóculo celular inicial, meio de cultivo e concentração de suplementos adicionados, temperatura e tempo de incubação, são cruciais para o desenvolvimento de um ensaio de determinação de vírus vivo sensível o suficiente para detectar quantidades mínimas de vírus rábico viável em amostras de suspensão viral presumidamente inativadas (TAKAYAMA-ITO et al., 2014). As condições ótimas para o cultivo de células BHK-21 utilizadas para o ensaio de recuperação viral aqui determinadas foram: inóculo celular inicial de 50 μ L de suspensão celular a $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL em placas de 96 poços, suplementação do meio de cultivo padrão MCPI com 2,5% de SFB, temperatura de cultivo de 37°C e 72 horas de incubação após a inoculação da amostra a ser analisada. Estas condições diferem ligeiramente de ensaios já descritos em literatura, principalmente com relação à concentração do inóculo celular e tempo de incubação.

A concentração celular do inóculo inicial está diretamente ligada ao tempo de incubação da amostra, uma vez que a taxa de crescimento celular desta linhagem é consideravelmente alta. Portanto, quanto maior o período de incubação, menor deverá ser o inóculo inicial. Estudos relatam concentrações iniciais de $2,5$ a 5×10^5 ϕ /mL para períodos de incubação de 22 a 48 horas (KRÄMER et al., 2009, 2013; MEHTA, 2017; MOREIRA et al., 2019; TAKAYAMA-ITO et al., 2014), assim a concentração definida de $2,0 \times 10^5$ ϕ /mL para 72 horas de cultivo está condizente com a relação de concentração e tempo de incubação, resultando em monocamadas confluentes e sem grumos, o que possibilita uma ideal avaliação da taxa de recuperação viral pelo método de IFD.

Células BHK-21 podem ser cultivadas em vários meios de cultivo diferentes, porém a maioria deles requer a adição de soro fetal bovino, um componente biológico que fornece fatores de crescimento e de adesão, hormônios, minerais e outros elementos imprescindíveis para o crescimento celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; REDDY; REDDY; RAYULU, 2016). Entretanto, este suplemento possui desvantagens importantes, como presença de altas concentrações de proteína animal e potencial presença de contaminantes principalmente *Mycoplasma sp*

(ALVES; GUIMARÃES, 2010). Todavia, a maior desvantagem em relação ao uso de SFB é seu custo de produção extremamente elevado e o fato de que sua produção envolve o sacrifício de fetos bovinos (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Para contornar os problemas práticos, monetários e, principalmente, éticos do uso desse produto, vários estudos estão sendo conduzidos para a elaboração de ensaios e métodos de produção de vacinas com a utilização de meios de cultivo alternativos que não necessitam de suplementação de SFB (LEME, 2016; MERTEN et al., 1999; PERRIN; MORGEAUX, 1995; REDDY; REDDY; RAYULU, 2016; TAPPARO, 2009).

Infelizmente, quando levada em consideração a intenção de desenvolver um método para recuperação viral prático para implantação em uma rotina de produção industrial de vacina viral, mas, ainda assim, sensível para o fim pretendido, a utilização de diferentes meios de cultura se torna inviável. Por esta razão, a alternativa procurada foi a redução da concentração de SFB suplementada ao meio de cultivo padrão utilizado para o cultivo da linhagem celular na produção da vacina antirrábica, que por já ser um meio combinado (DMEM e HAM F-12 suplementado com piruvato de sódio, bicarbonato de sódio e glicose), possui grande parte dos nutrientes necessários para o crescimento celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Não foi possível a completa eliminação do SFB, uma vez que as concentrações de 0 e 1% não apresentaram crescimento celular adequado, porém a concentração de 2,5% definida como ótima é consideravelmente inferior às demais descritas em literatura (INOUE et al., 2003; KRÄMER et al., 2013; MEHTA, 2017; REDDY; REDDY; RAYULU, 2016; TAKAYAMA-ITO et al., 2014).

Usualmente, técnicas de isolamento viral apresentam melhores resultados utilizando etapas de subcultivo, pela diminuição de componentes tóxicos inibitórios com a diluição ocorrida durante as passagens (TAKAYAMA-ITO et al., 2014). Porém este fato não foi observado neste estudo, o que pode ser explicado pela produção de interferon pelas células BHK-21. As células infectadas na cultura original produzem a citocina e, ao ser inoculado o sobrenadante da cultura original na segunda placa, tornam as novas células resistentes à infecção pelo vírus rábico. Sellers em seu estudo, observou que esta linhagem de células tem produção aumentada de interferon quando inoculada com vírus causador da febre amarela, resultando no não aparecimento de efeitos citopáticos (SELLERS, 1963). Neste estudo, as taxas de recuperação viral não apresentaram melhora após 1 ou 2 subcultivos, portanto esta metodologia não foi incorporada ao ensaio de inativação

viral desenvolvido.

O limite de detecção determinado no ensaio de recuperação viral foi de 10^{-2} TCID₅₀/mL, notavelmente menor do que os reportados por Takayama e colaboradores de 1 uff/mL de vacina ou mesmo por Blum e colaboradores de 10 partículas virais/mL de produto. Entretanto, esta comparação não pode ser feita de maneira clara, uma vez que as unidades de titulação viral não são intercambiáveis. Além disso diferentes linhagens celulares e cepas virais foram utilizadas pelos estudos, assim como diferentes condições de cultivo, o que soma à dificuldade de comparação (BLUM et al., 1998; TAKAYAMA-ITO et al., 2014).

Analizando os diversos produtos intermediários do processo de produção da vacina antirrábica inativada (Figura 3), ficou demonstrado que os conservantes e adjuvantes utilizados na sua formulação interferem negativamente na condução do ensaio de vírus vivo residual *in vitro*, já que, por serem agentes tóxicos, impedem o crescimento das células utilizadas para o isolamento viral. Blum e colaboradores também reportaram resultados semelhantes, com estes insumos afetando o limite de detecção do ensaio por eles elaborado (BLUM et al., 1998). Definiu-se então que a amostra utilizada no ensaio de detecção de vírus viável deve ser a suspensão viral inativada adicionada somente de estabilizante sacarose, que configura o produto intermediário do processo de produção da vacina antirrábica na sua etapa anterior à adição de conservante (timerosal) e adjuvante (hidróxido de alumínio).

O ensaio de recuperação viral *in vitro*, em células BHK-21, foi considerado cerca de três vezes mais sensível quando comparado com o *in vivo* exigido pela agência regulatória brasileira, resultado também encontrado por Takayama e colaboradores (TAKAYAMA-ITO et al., 2014). Este fato pode ser explicado pela alta variabilidade passível de existir em ensaios biológicos *in vivo*, pela utilização de pequenos volumes de amostras e quantidade de animais utilizados. Em contrapartida, o ensaio *in vitro* analisa volumes mais significativos de amostra, em um maior número de replicatas com uma população de células controlada, minimizando variabilidades inerentes ao ensaio *in vivo*.

A característica da amostra utilizada é uma limitação importante do ensaio, uma vez que a maioria das vacinas antirrábicas veterinárias apresentam agentes conservantes e adjuvantes em suas formulações. Por este motivo o teste não pode ser aplicado para o controle de qualidade final de produtos com esta composição. Entretanto, a implantação deste ensaio pode e deve ser feita em etapas anteriores,

como controle de processo e controle de qualidade interno da produção da vacina, utilizando produtos intermediários da produção como amostra a ser analisada. A realização do ensaio *in vitro* neste momento é uma maneira eficaz de garantir a qualidade do produto que será utilizado para a formulação final da vacina. Deste modo, é possível reduzir a quantidade de ensaios *in vivo* executados durante o processo de produção em 2/3 e, conseqüentemente, o número de animais de laboratório utilizados.

Outra vantagem do método aqui desenvolvido é a redução do tempo de análise do produto intermediário. Os protocolos de ensaios de controle de qualidade de vacinas antirrábicas elaborados pela Farmacopéia Européia e OMS descrevem metodologias de ensaios de recuperação viral *in vitro* com duração de 14 a 21 dias, e os ensaios *in vivo* exigidos pelas demais agências regulatórias têm duração de 21 até 28 dias (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b; MAPA, 1988; USP, 2019). Takayama e colaboradores desenvolveram um ensaio de recuperação viral com duração total de 6 dias para a avaliação de vacina humana utilizando células Neuro-2a (TAKAYAMA-ITO et al., 2014). No presente trabalho, contudo, o ensaio *in vitro* foi tão sensível quanto o *in vivo* exigido pela autoridade sanitária brasileira, porém com duração de apenas 4 dias, o que confere grande agilidade no tempo em que o produto intermediário da produção de vacina antirrábica deve permanecer em quarentena até que seja garantida a completa inativação da suspensão viral produzida.

Visando uma maior robustez do ensaio de detecção de vírus vivo em amostras de suspensão viral inativada, foi desenvolvido para uso em conjunto com o ensaio de recuperação viral em cultivo, um método molecular para quantificação viral utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Inicialmente foram utilizados 2 grupos de oligonucleotídeos para a quantificação viral. Os iniciadores e sonda pertencentes ao grupo 1 (RN1), desenhados especificamente para este estudo, obtiveram resultados satisfatórios com relação à identificação e quantificação do gene da nucleoproteína do vírus rábico (RABVgp1), portanto foi o escolhido para utilização no ensaio de quantificação viral.

Contudo, o grupo 2 (RN2) não obteve resultados adequados. Analisando a sequência nucleotídica desses iniciadores e sonda, foi constatado que estas não reconhecem a cepa de RABV utilizada na pesquisa. Este grupo de oligonucleotídeos

foi desenhado com base em dois genomas: DRV-NG11 (GenBank Ac. No. KC196743) e CAR_11/001h (GenBank Ac. No. KF977826.1) (Faye, 2017), já o grupo de oligonucleotídeos RN1 foi desenhado tendo como modelo o gene N RABVgp1 (GenBank NC_001542.1). Alinhando as sequências dos genes notou-se uma diferença em vários nucleotídeos, as sequências base para o grupo RN2 não são totalmente compatíveis com a sequência base para o grupo 1, e isso pode explicar porque os iniciadores e sonda do grupo 2 não foram capazes de reconhecer o RNA viral utilizado nos experimentos.

Após definidas as concentrações de iniciadores e sonda a serem utilizadas para a quantificação do gene RABVgp1, foi realizada a construção das curvas-padrão dos ensaios *singleplex*, que quantifica somente o RABVgp1, e *duplex*, capaz de identificar o mRNA β -actina de células BHK-21, agindo como controle interno da reação, ao mesmo tempo que quantifica o RABVgp1. Foi escolhido o mRNA β -actina de células BHK-21 como controle interno da reação de extração de material genético das amostras provenientes do ensaio de recuperação viral por ser um gene constantemente expresso nestas células em multiplicação e, desta forma, ser um marcador ideal para garantir que a extração de material genético viral foi bem-sucedida e não houve inibição da reação de PCR (TANG et al., 2015; TOUSSAINT et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

Os resultados de eficiência, de 104% e 103% respectivamente, e coeficiente de correlação igual a 0,999 das duas curvas-padrão, atesta para o fato de que a identificação do mRNA β -actina selecionado para controle interno não interfere na quantificação viral pela reação com os oligonucleotídeos do grupo RN1, o que demonstra que esse ensaio pode ser aplicado com sucesso para análises quantitativas de carga viral em amostras de suspensão viral inativada. A padronização da reação *duplex* utilizando sondas para identificação do RABVgp1 e mRNA β -actina acopladas aos fluoróforos FAMTM e VIC[®], respectivamente, confere agilidade à realização dos ensaios e utiliza menos insumos, melhorando assim a relação custo-benefício do teste. Outra vantagem de reações *duplex* é a necessidade de menor volume de amostra por reação, uma vez que a quantificação viral e identificação do controle interno da reação ocorrem ao mesmo tempo, num mesmo poço da placa de 96 poços específica para PCR.

A avaliação da sensibilidade analítica revelou a capacidade do ensaio *duplex* detectar concentrações baixas de RNA viral, sendo o limite de quantificação de 10^1

TCID₅₀/mL indicador de um ensaio altamente sensível, similar a outros desenvolvidos para a quantificação de RNA viral utilizando a técnica de RT-qPCR previamente publicados (DACHEUX et al., 2016; FAYE et al., 2017; HUE et al., 2011; STOKES et al., 2012; WADHWA et al., 2017). Os outros itens pertinentes para a padronização do ensaio de quantificação do RNA rábico, como repetibilidade inter e intra-ensaios, reprodutibilidade e determinação do limite de detecção de 10⁻¹ TCID₅₀/mL, também se mostraram satisfatórios. Observa-se que o limite de detecção do ensaio de recuperação viral *in vitro* foi inferior ao da quantificação viral por RT-qPCR, 10⁻² TCID₅₀/mL e 10⁻¹ TCID₅₀/mL, respectivamente. Usualmente técnicas de biologia molecular são mais sensíveis que ensaios *in vitro* (FAYE et al., 2017), porém não foi o encontrado neste estudo.

Do mesmo modo, a análise da especificidade da reação e sua seletividade para detectar e, conseqüentemente, quantificar o RABV, revelou que os oligonucleotídeos desenhados neste estudo são altamente específicos, pois não reconhecem outros vírus causadores de encefalites. Entretanto, houve a detecção de β -actina humana, certamente devido ao fato de que os mRNAs de β -actina oriundos das espécies *Homo sapiens* e *Mesocricetus auratus* serem homólogos.

A padronização de um ensaio *duplex* sensível capaz de quantificar o RNA do vírus rábico, tendo o mRNA da β -actina como controle interno, abre uma ampla gama de possibilidades para também expandir este método ao diagnóstico clínico. Isto é possível por ser o ensaio uma ferramenta quantitativa confiável e os oligonucleotídeos para identificação do controle interno serem capazes de reconhecer também o gene humano. No entanto, para ser aplicável ao diagnóstico de raiva em humanos ou animais, mais análises devem ser realizadas.

A última etapa do processo de padronização do método molecular para quantificação do RABV foi comprovar a sua aplicabilidade no auxílio da determinação *in vitro* do vírus vivo residual em vacinas inativadas. Para tanto, foi analisada amostra de suspensão viral ativa e a mesma suspensão após inativação química com beta-propiolactona. Demonstrou-se que o ensaio desenvolvido reconhece tanto o vírus vacinal inativado quanto o vírus rábico vivo, apresentando valores de ciclos de quantificação muito similares. O agente químico beta-propiolactona, utilizado para inativação viral na produção de vacina antirrábica, atinge sua finalidade desencadeando a alquilação dos resíduos de RNA viral, ocasionando associações intra e inter-fitas, que resultam em erros de replicação.

Estes efeitos culminam em alterações de estrutura, o que impede que o RNA viral seja usado como molde por várias polimerases, inativando assim o vírus (PERRIN; MORGEAUX, 1995). Contudo, ficou evidenciado que os iniciadores e a sonda para quantificação da nucleoproteína rábica íntegra também conseguem identificar seus alvos na amostra com RNA viral inativado. O agente alquilante possivelmente causa quebras aleatórias no RNA viral maiores do que o tamanho do alvo de amplificação, inativando o vírus, porém ainda deixando-o passível de quantificação através da reação de RT-PCR em tempo real.

Após a padronização dos testes de recuperação viral *in vitro* e de quantificação viral por RT-qPCR, foi avaliada a combinação dos mesmos para a formulação do ensaio de inativação viral propriamente dito. Utilizando a diluição seriada de vírus rábico ativo em amostras de suspensão viral inativada, pode-se observar que a técnica de recuperação viral detecta quantidades inferiores de vírus replicante, ao passo que o ensaio molecular não é capaz de identificar amostras positivas abaixo de 10^1 TCID₅₀/mL. Isso se deve ao fato da reação de RT-qPCR ser capaz de identificar vírus viável assim como inativado, mas em concentrações menores que 10^1 TCID₅₀/mL essa diferenciação não é mais possível, uma vez que o log da carga viral não altera mais do que 0,5 entre as amostras (NOLTE, 1999; SENECHAL; JAMES, 2012).

A validação do ensaio *in vitro* para detecção de vírus rábico residual viável, realizada com amostras de suspensão viral inativada com resultados satisfatórios em análise prévia pelo ensaio de inativação viral *in vivo*, resultou em 80% de concordância, onde 8 amostras apresentaram resultados satisfatórios também pelo método *in vitro*. No entanto, duas amostras de suspensão viral inativada resultaram em altas taxas de recuperação viral, com porcentagens acima de 65% na IFD, e quantificação viral por RT-qPCR na hora 72 também elevada, sugerindo a presença de vírus rábico ativo.

Tal suspeita foi confirmada por métodos de imagem, com partículas virais suspeitas sendo observadas em microscopia eletrônica de transmissão das células em cultivo, inoculadas com as amostras discordantes, e por inoculação em animais saudáveis, sendo observado o desenvolvimento de sintomas característicos de raiva. A doença foi posteriormente confirmada com a visualização de focos positivos por imunofluorescência direta, realizando o ensaio padrão para diagnóstico de raiva, pela visualização de partículas virais suspeitas em microscopia eletrônica de

transmissão e por análise histopatológica do tecido nervoso destes animais. A presença de corpúsculos de Negri somado aos vários achados, característicos de infecção viral em tecido neural, corrobora com a presença de vírus rábico ativos nestas amostras.

Este trabalho apresenta algumas limitações que podem dificultar sua implantação em diferentes centros de produção de vacina antirrábica. Entre estes destaca-se que o ensaio desenvolvido no presente estudo utiliza células BHK-21 para o isolamento e recuperação viral, em razão da produção da vacina ser com esta linhagem. Uma vez que produtores que utilizam diferentes linhagens para a produção do vírus rábico devem optar sempre que possível pela utilização da mesma linhagem em seus ensaios de controle de qualidade, tem-se a necessidade de padronizar o presente ensaio de acordo com as características de cultivo específicas de cada linhagem empregada. Entretanto, deve-se levar em conta que as linhagens indicadas para ensaios de controle de qualidade de vacinas antirrábicas são a VERO, Neuroblastoma 2A e BHK-21 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2014b).

Outra limitação é a impossibilidade de analisar amostras que contém conservantes ou adjuvantes, devido a incompatibilidade destes agentes com o cultivo celular. Como forma de contornar esta limitação, poderia ser avaliada se a diluição de amostras contendo estes agentes tóxicos possibilitaria a realização do ensaio *in vitro*. Esta condição está presente na maioria das vacinas veterinárias, restringindo a aplicabilidade do método ao controle de qualidade interno de vacinas com esta característica. Por outro lado, vacinas que não levam estes componentes em suas formulações, usualmente de uso humano, podem implantar este ensaio como uma alternativa viável ao ensaio *in vivo* exigido atualmente para a liberação dos lotes deste tipo de vacina.

Deve-se ainda destacar que o ensaio de quantificação viral pelo método molecular permanece apresentando resultados positivos de quantificação viral e em altos títulos, mesmo com amostras de vírus inativado, fato que impossibilita seu uso sem a diluição sucessiva da amostra previamente à realização do ensaio de quantificação.

Mesmo considerando as limitações observadas anteriormente, a detecção de vírus rábico viável em amostras de suspensão viral anteriormente aprovadas em controle interno pelo ensaio de vírus vivo residual *in vitro* é um achado de extrema

importância, que comprova a maior sensibilidade do método desenvolvido neste trabalho. Por este motivo a inclusão desta nova metodologia na avaliação de rotina da inativação viral deve ser avaliada pelos centros produtores de vacina antirrábica inativada. A capacidade do ensaio de recuperar vírus vacinal vivo nestas amostras confere maior segurança ao controle de qualidade intermediário do processo de produção da vacina, uma vez que é possível barrar a liberação de lotes que provavelmente seriam aprovados pelo ensaio *in vivo* menos sensível. Uma vez identificados lotes de produtos intermediários com resultados positivos no ensaio *in vitro*, este poderá passar por um novo processo de inativação e controle *in vitro* antes de ser liberado para a formulação da vacina e controle final *in vivo*.

Entretanto, a ampla implementação deste método certamente não ocorrerá de maneira fácil. Para a sua aprovação por órgãos regulatórios, deve ser realizada uma validação nacional, conduzida pelo BRACVAM, entidade nacional responsável pelo desenvolvimento e validação de métodos alternativos. Porém, centros produtores com características de produção diferentes, como linhagem celular e adição ou não de conservantes e adjuvantes, requerem adaptações específicas no ensaio para possibilitar sua realização. Por este motivo a validação nacional será desafiadora e necessitará de estudos complementares para sua correta realização.

Por outro lado, apesar das dificuldades previstas para a implantação do método, o mesmo pode ser adaptado para o controle de qualidade de outras vacinas virais inativadas, desde que seja possível a realização de IFD com o vírus produzido, assim como o desenvolvimento de um ensaio de quantificação viral por PCR. A possibilidade de adaptação da técnica à outras vacinas virais pode levar a uma maior redução na utilização de animais de laboratório, objetivo final de todos engajados na eliminação de ensaios *in vivo*.

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio *in vitro* a fim de verificar a presença de vírus vivo residual em vacina antirrábica veterinária produzida por cultivo celular e posterior inativação viral.

O isolamento viral em conjunto com IFD foi satisfatoriamente padronizado, revelando ser uma técnica simples com bons resultados de identificação da recuperação viral.

O uso de subcultivo não foi adequado para este ensaio, já que este artifício não contribuiu para a recuperação viral mais eficiente.

A amostra ideal a ser utilizada no ensaio de recuperação viral determinada foi o produto intermediário da produção da vacina, suspensão viral inativada, antes da adição de conservantes e adjuvantes, pois estes são tóxicos para o cultivo das células BHK-21 utilizadas no ensaio.

O ensaio *duplex* de RT-qPCR apresentou alta especificidade, sensibilidade e repetibilidade para a quantificação de vírus rábico vacinal, mostrando ser útil para a quantificação deste vírus. Entretanto, este ensaio não é capaz de diferenciar amostras de vírus ativo das de vírus inativo, pois ainda é possível a quantificação do material genético inativado.

O método *in vitro* desenvolvido apresentou ser três vezes mais sensível que o ensaio de vírus vivo residual *in vivo* exigido legalmente. O ensaio de *in vitro* combinando as técnicas de isolamento viral, imunofluorescência direta e quantificação viral por RT-PCR é capaz de identificar amostras de suspensão viral não inativadas completamente que foram aprovadas pelo ensaio *in vivo*, fato que confere maior segurança no controle de qualidade intermediário do processo de produção da produção de vacina antirrábica inativada veterinária.

O ensaio de vírus vivo residual *in vitro* desenvolvido produz resultados em 4 dias, reduzindo o tempo de análise do controle de qualidade intermediário, com custo de realização inferior ao ensaio *in vivo*. Sua implantação na produção da vacina antirrábica possibilitará a redução de 2/3 no número de camundongos utilizados, uma vez que pode substituir o ensaio *in vivo* realizado no controle de qualidade intermediário do processo de produção.

9. PERSPECTIVAS

Para conclusão definitiva deste estudo, é necessária a confirmação dos achados em microscopia eletrônica de transmissão com a realização de ensaios de imunocitoquímica também por essa técnica de imagem.

O ensaio de vírus vivo residual *in vitro* desenvolvido neste estudo será validado durante a produção da vacina antirrábica, no Centro de Desenvolvimento e Produção de Imunobiológicos – TECPAR, no ano de 2019. Ao final desta etapa, se a validação ocorrer de modo satisfatório, o método será implantado no controle de qualidade do produto intermediário da vacina antirrábica inativada veterinária produzida pelo TEECPAR, substituindo o ensaio *in vivo* realizado nesta etapa.

Posteriormente serão realizados estudos de validação do processo de inativação da suspensão viral, comparando diversas concentrações de beta-propiolactona assim como outros agentes inativantes.

10. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Os resultados preliminares deste projeto foram apresentados na II Conferência Panamericana sobre Métodos Alternativos, realizada nos dias 23 e 24 de agosto de 2018 na cidade do Rio de Janeiro, RJ, conforme certificados em anexo (ANEXO 3 e 4).

Foi recebido uma gratificação na forma de *Young Scientist Travel Award* para participação no *21st European Congress on Alternatives to Animal Testing*, realizado nos dias 23 a 26 de setembro de 2018 na cidade de Linz, Áustria, onde foi apresentado um pôster intitulado “*Validation of an in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines*”, conforme certificados em anexo (ANEXO 5 e 6).

A padronização do ensaio de RT-qPCR foi descrita em um artigo intitulado “*Development and validation of a real-time RT-PCR assay for quantification of rabies virus as a quality control of inactivated rabies vaccines*”, já submetido à revista *Journal of Virological Methods* (IF:1,756), e se encontra em fase de revisão (ANEXO 7).

O desenvolvimento do método *in vitro* de detecção de vírus viável foi descrito em um artigo intitulado “*Development and validation of an assay for the detection of residual viable virus in inactivated rabies vaccines.*” que está em processo de escrita para posterior submissão à revista *Journal of Virology* (IF: 4,368).

REFERENCIAS

- ABD-ELGHAFFAR, A. A. et al. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. **Vaccine**, v. 34, n. 6, p. 798–802, 2016.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Cultivo Celular**. 1. ed. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.
- ANVISA. **Farmacopéia Brasileira** (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ed.) Brasília, 2010.
- ASTILL, J. et al. Examination of the effects of virus inactivation methods on the induction of antibody- and cell-mediated immune responses against whole inactivated H9N2 avian influenza virus vaccines in chickens. **Vaccine**, v. 36, p. 3908–3916, 2018.
- ASTRAY, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C. A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. **Archives of Virology**, v. 162, p. 323–332, 2017.
- BANARJEE, A. K.; CHATTOPADHYAY, D. Structure and function of the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. **Advances in Virus Research**, v. 38, p. 99–124, 1990.
- BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125–144, 2007.
- BLUM, S. et al. How to prove complete virus inactivation in rabies vaccines. A comparison of an in vivo to an in vitro method. **ALTEX**, v. 15, n. 5, p. 46–49, 1998.
- BONNAFOUS, P. et al. Biochimica et Biophysica Acta Treatment of influenza virus with Beta-propiolactone alters viral membrane fusion. **BBA - Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 355–363, 2014.
- BRIEN, K. L. O.; NOLAN, T.; WG, S. The WHO position on rabies immunization – 2018 updates. **Vaccine**, 2018.
- BRUCKNER, L. et al. Three Rs Approaches in the Quality Control of Inactivated Rabies Vaccines: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 48. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, v. 31, n. 4, p. 429–454, 2003.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CASEY, W. et al. Improving Animal Welfare and Reducing Animal Use for Human Vaccine Potency Testing: State-of-The-Science and Future Directions. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 33–46, 2011.

CLAASSEN, I. Case study of development, validation, and acceptance of a non-animal method for assessing veterinary vaccine potency. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 175–183, 2011.

CLIQUET, F.; AUBERT, M.; SAGNÉ, L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 79–87, 1998.

DACHEUX, L. et al. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 1410–1417, 2008.

DACHEUX, L. et al. Dual Combined Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Lyssavirus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1–18, 2016.

DAVID, S. C. et al. The effect of gamma-irradiation conditions on the immunogenicity of whole-inactivated Influenza A virus vaccine. **Vaccine**, v. 35, n. 7, p. 1071–1079, 2017.

DAVIS, B. M.; RALL, G. F.; SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 451–471, 2015.

DEMBINSKI, J. L. et al. Hydrogen peroxide inactivation of influenza virus preserves antigenic structure and immunogenicity. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 232–237, 2014.

DIETZGEN, R. G. et al. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. **Virus Research**, v. 227, p. 158–170, 2017.

DIETZSCHOLD, B. et al. New approaches to the prevention and eradication of rabies. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 399–406, 2003.

DRAAYER, H. Overview of currently approved veterinary vaccine potency testing methods and methods in development that do not require animal use. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 171–174, 2011.

DUARTE, L. **A raiva**. [s.l.] Universidade de Évora, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Rabies Vaccine (inactivated) for Veterinary Use. In: **European Pharmacopoeia**. 8. ed. [s.l.: s.n.]. p. 1008–1011.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Rabies Vaccine for Human Use Prepared in Cell Cultures - *Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum*. In: **European Pharmacopoeia**. 8. ed. [s.l.: s.n.]. p. 3952–3954.

F. HUANG, W. AHMAD, M. DUAN, Z. LIU, Z. GUAN, M. ZHANG, B. QIAO, Y. LI, Y. SONG, Y. SONG, Y. CHEN, M. A. A. Efficiency of live attenuated and inactivated rabies viruses in prophylactic and post exposure vaccination against the street virus strain. **Acta virologica**, v. 59, n. 1, p. 117–124, 2015.

FAYE, M. et al. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 243, p. 120–130, 2017.

FOOKS, A. R.; BANYARD, A. C.; ERTL, H. C. J. New human rabies vaccines in the pipeline. **Vaccine**, 2018.

FRACASTORO, H. Rabies. In: **De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione**. Venice: [s.n.]. p. 124–133.

HADDAD, A. et al. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

HILL, R. E. Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals In the Development and Testing of Veterinary Biologics in The United States; a Strategic Priority. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 141–145, 2011.

HORIUCHI, Y. et al. Strategic Approaches for Developing Alternative Tests for Safety and Potency of Vaccines. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 156–163, 2011.

HUE, K. D. T. et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 2, p. 168–173, 2011.

INOUE, K. I. et al. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. **Journal of Virological Methods**, v. 107, n. 2, p. 229–236, 2003.

IRONS, J. et al. The public health importance of bats. **Texas Reports in Biology and Medicine**, v. 15, n. 2, p. 292–298, 1957.

ITO, N.; MOSELEY, G. W. G. W.; SUGIYAMA, M. Review the importance of immune evasion in the pathogenesis of rabies virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 7, p. 1089–98, 2016.

IVES, A.; DIEUZY-LABAYE, I.; ABELA-RIDDER, B. Global characteristics of the rabies biologics market in 2017. **Vaccine**, 2018.

JACKSON, A. C. **Rabies: Scientific basis of the disease and its management**. 3. ed. Oxford, UK: Academic Press, 2013.

KALLEL, H. et al. A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 441–446, 2003.

KANITZ, F. A. et al. Virus isolation in cell culture for confirmatory diagnostic of rabies in bovine specimens Isolamento viral em cultivo celular para o diagnóstico. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2193–2196, 2015.

KRÄMER, B. et al. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 119–126, 2009.

KRÄMER, B. et al. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. **Biologicals**, v. 41, n. 6, p. 400–406, 2013.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95–125, 2006.

LAFON, M. et al. Evidence for a viral superantigen in humans. **Nature**, v. 358, p. 507–510, 1992.

LAHAYE, X. et al. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. **Journal of virology**, v. 83, n. 16, p. 7948–58, 2009.

LARGHI, P. et al. Ethylenimine-Inactivated Rabies Vaccine of Tissue Culture Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 26–33, 1976.

LEMBO, T. et al. Renewed Global Partnerships and Redesigned Roadmaps for Rabies Prevention and Control. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

LEME, J. **Cultivo de células bhk-21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino adaptada para crescimento em suspensão**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

LOCKHART, B. P.; TORDO, N.; TSIANG, H. Inhibition of Rabies Virus Transcription in Rat Cortical Neurons with the Dissociative Anesthetic Ketamine Mg2e. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1750–1755, 1992.

MAHADEVAN, A. et al. Perspectives in Diagnosis and Treatment of Rabies Viral Encephalitis: Insights from Pathogenesis. **Neurotherapeutics**, v. 13, p. 477–492, 2016.

MAIER, T. et al. Management and Outcomes after Multiple Corneal and Solid Organ Transplantations from a Donor Infected with Rabies Virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 1112–1119, 2010.

MAPA. **Portaria nº 228, de 25 de outubro de 1988 - Controle da produção e comercialização de vacinas e soro anti-rábicos para uso veterinário**. Brasil, 1988.

MAPA. **Instrução normativa nº 8, de 12 de abril de 2012**. Brasil, 2012.

MAVRAKIS, M. et al. Isolation and Characterisation of the Rabies Virus N^o -P Complex Produced in Insect Cells. **Virology**, v. 305, p. 406–414, 2003.

MEHTA, S. Use of rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for in vitro evaluation of anti-rabies activity. **VirusDisease**, v. 28, n. 2, p. 127–132, 2017.

MERTEN, O. et al. The new medium MDSS2N , free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. **Cytotechnology**, v. 30, p. 191–201, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica** Brasil, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de Tratamento da Raiva Humana no Brasil**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Normas técnicas de profilaxia da raiva humana**. Brasil, 2011b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Raiva: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

MONDAL, S. K. et al. Validation of the inactivant binary ethylenimine for inactivating rabies virus for veterinary rabies vaccine production. **Biologicals**, v. 33, p. 185–189, 2005.

MOREIRA, W. C. et al. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. **Journal of Virological Methods**, v. 263, p. 54–59, 2019.

NOAH, D. L. et al. Epidemiology of Human Rabies in the United States , 1980 to 1996. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 11, p. 922–930, 1998.

NOLAN, T.; HUGGETT, J.; SANCHEZ, E. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). **LGC**, 2013.

NOLTE, F. S. Impact of viral load testing on patient care. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 123, n. 11, p. 1011–1014, 1999.

OIE. Rabies. In: **Terrestrial Manual**. [s.l: s.n.].

PAGET, S. **Pasteur and after Pasteur**. 1. ed. London: London A. & C. Black, 1914.

PARÁ, M. An Outbreak of Post-Vaccinal Rabies (Rage de Laboratoire) in Fortaleza , Brazil, in 1960. **Bulletin World Health Organization**, v. 33, p. 177–182, 1965.

PAWAR, S. D. et al. Evaluation of different inactivation methods for high and low pathogenic avian influenza viruses in egg-fluids for antigen preparation. **Journal of Virological Methods**, v. 222, p. 28–33, 2015.

PERRIN, P.; MORGEAUX, S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. **Biologicals**, v. 23, n. 3, p. 207–11, 1995.

POCH, O. et al. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 1153–1162, 1990.

PUSHKO, P. et al. Multi-clade H5N1 virus-like particles: Immunogenicity and protection against H5N1 virus and effects of beta-propiolactone. **Vaccine**, v. 36, n. 29, p. 4346–4353, 2018.

QUINTEL, B. K. et al. Advanced oxidation technology for the development of a next-generation inactivated West Nile virus vaccine. **Vaccine**, 2018.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 145–151, 2009.

REULARD, P. Cell-culture vaccines for veterinary use. In: MESLIN, F. M.; KAPLAN, M. M.; KOPROWOSKI, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: WHO, 1996. p. 314–323.

REDDY, B. P.; REDDY, B. P.; RAYULU, D. J. Effects of Fetal Bovine Serum Concentration on the Growth and Survival of BHK 21 Cell Lines. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 7, n. 2, p. 122–128, 2016.

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. **F1000Research**, v. 6, p. 184–206, 2017.

RUPPRECHT, C.; NAGARAJAN, T. (EDS.). **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention - Volume 2**. California: Academic Press, 2015.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, p. 229–240, 1991.

SARKAR, A. et al. Biologicals Comparison of different inactivation methods on the stability of Indian vaccine strains of foot and mouth disease virus. **Biologicals**, v. 48, p. 10–23, 2017.

SASAKI, Y. et al. Analysis of the beta-propiolactone sensitivity and optimization of inactivation methods for human influenza H3N2 virus. **Journal of Virological Methods**, v. 235, p. 105–111, 2016.

SCHLOTTAU, K. et al. Development of molecular confirmation tools for swift and easy rabies diagnostics. **Virology Journal**, v. 14, p. 184–196, 2017.

SELLERS, R. F. The use of a line of hamster kidney cell (BKH 21) for growth of arthropod-borne viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 433–437, 1963.

SENECHAL, B.; JAMES, V. L. A. Ten years of external quality assessment of human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3614–3619, 2012.

SHAHRUDIN, S. et al. Gamma-irradiated rotavirus: A possible whole virus inactivated vaccine. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. 1–15, 2018.

SHIN, J. et al. International regulatory requirements for vaccine safety and potency testing: A WHO perspective &. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 164–170, 2011.

SINGH, R. et al. Rabies – epidemiology , pathogenesis , public health concerns and advances in diagnosis and control : a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 47, n. 1, p. 212–251, 2017.

SIPAHIOGLU, U.; ALPAUT, S. Transplacental rabies in humans [Turco]. **Mikrobiyol Bulteni**, v. 19, n. 2, p. 95–99, 1985.

SISSOEFF, L. et al. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75 NTR receptor. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2543–2552, 2005.

STOKES, W. et al. Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. **Biologicals**, v. 40, p. 369–381, 2012.

TAKAYAMA-ITO, M. et al. A sensitive invitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 42–47, 2014.

TANG, C. et al. Analysis of gene expression profiles reveals the regulatory network of cold-inducible RNA-binding protein mediating the growth of BHK-21 cells. **Cell Biology International**, v. 39, p. 678–689, 2015.

TAPPARO, A. F. **Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamadas de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrícus**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

TARANTOLA, A.; CYRILLE, M.; BRIGGS, D. J. Evaluating new rabies post-exposure prophylaxis (PEP) regimens or vaccines. **Vaccine**, 2018.

TOUSSAINT, J. F. et al. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 115–123, 2007.

ULLAS, P. T.; DESAI, A.; MADHUSUDANA, S. N. Rabies DNA Vaccines : Current Status and Future. **World Journal of Vaccines**, v. 2, p. 36–45, 2012.

USP. **1235 - Vaccines for Human Use - General Considerations**, 2019. (Nota técnica).

VERDELIO, A. Amazonas registra o segundo caso de sobrevivência por raiva humana no Brasil. **Agência Brasil**, p. 1–5, 11 jan. 2019.

VETTER, J. M. et al. Survival After Transplantation of Corneas From a Rabies-Infected Donor. **Cornea**, v. 30, n. 2, p. 241–244, 2011.

WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005258, 2017.

WHO. **Recommendations for Inactivated Rabies Vaccine**. Geneva: [s.n.].

WHO. **Recommendations for Inactivated Rabies Vaccine for Human Use Produced in Cell Substrates and Emrbyonated Eggs** WHO Technical Report Series. Geneva: [s.n.].

WHO. WHO Expert Consultation on rabies. Second report. **WHO Technical report series.**, v. 982, p. 1–139, 2013a.

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases** World Health Organization. [s.l: s.n.].

WHO. **Media centre Rabies, Fact Sheet nº 99.** [s.l: s.n.].

WHO. **Rabies - Fact Sheet nº 099.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>.

WHO. **ZERO BY 30: The Global Strategic Plan to End Human Deaths From Dog-mediated Rabies by 2030.** Geneva: [s.n.].

WHO. **Rabies - Cell-culture isolation techniques.** Disponível em: <<https://www.who.int/rabies/human/cellcultureisolation/en/>>.

WILLOUGHBY, R. E. et al. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508–2514, 2005.


WOODLAND, R. European Regulatory Requirements for Veterinary Vaccine Safety and Potency Testing and Recent Progress Towards Reducing Animal Use. **Procedia in Vaccinology**, v. 5, p. 151–155, 2011.

XU, H. et al. Real-time imaging of rabies virus entry into living vero cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11753–11764, 2015.

ZHANG, Y. et al. Preparation and characterization of a stable BHK-21 cell line constitutively expressing the Schmallerberg virus nucleocapsid protein. **Molecular and Cellular Probes**, v. 29, n. 4, p. 244–253, 2015.

ZHU, S.; GUO, C. Rabies control and treatment: From prophylaxis to strategies with curative potential. **Viruses**, v. 8, n. 11, p. 279–302, 2016.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

	FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO
PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS	USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO PROTOCOLO Nº <u>008/17</u> RECEBIDO EM: <u>19/06/2017</u>

Obs.: Todos os campos devem ser preenchidos. Em caso de não se aplicar, preencher "não se aplica".

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI). Na ausência destes, a estrutura química linear.

Lista das DCBs disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf.

1. PRAZO

Início: 06/03/2017

Término: 06/03/2019

2. TÍTULO DO PROJETO

VALIDAÇÃO DE ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAR INATIVAÇÃO DA VACINA VIRAL ANTIRRÁBICA

Área do conhecimento: Ciências Biológicas

Lista das áreas do conhecimento disponível em:

<http://www.capes.gov.br/avaliacao/tabela-de-areas-de-conhecimento>

3. RESPONSÁVEL

Nome completo	Beatriz Lourenço Correia Moreira
Instituição	TECPAR – LPV
Unidade	CIC
Departamento/Disciplina	Laboratório de Produção de Vacinas

REG 305.00.080 – Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação

Revisão: 00

Data: 03/02/2016

Pág. 1/18

TÊCPAR**FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE
AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM
EXPERIMENTAÇÃO****15. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO**

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de 17/08/17,
APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

A Comissão de Ética No Uso de Animais, na sua reunião de ____/____/____, emitiu
o parecer em anexo e retorna o Protocolo para sua revisão.

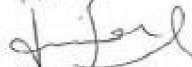
Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

Parecer dado ao protocolo (assinar e carimbar o parecer):

*Após conexões recomendadas conforme reunião de 23/08/17
o projeto foi aprovado por maioria de votos por esta
Comissão.*

17/08/17



Instituto de Tecnologia do Paraná

Jorge Minor Fernandes Inagaki
Médico Veterinário / CRMV-PR 10876 VP

ANEXO 2 – CHECK-LIST PARA O ENSAIO DE INATIVAÇÃO VIRAL *IN VITRO***ENSAIO DE INATIVAÇÃO VIRAL *IN VITRO* – IFD**

Amostra: _____ - 2,5% SFB – 37°C – 72 hr Data: ____/____/____

Mapa de trabalho – placa 96 poços:

(A: amostra; L: leitura)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
B	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
C	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
D	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
E	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
F	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
G	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A: PV	A: PV
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:
H	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A:	A: céls	A: céls
	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:	L:

Obs.: _____

Distribuição das células e inóculo de amostra na microplaca

() Adicionar 50 µL da suspensão celular em cada poço ($2,0 \times 10^5$ células/mL), selar a microplaca. Célula utilizada: _____ Passagem: _____

MCPI 2,5% SFB Lote: ____/____ PBS: ____/____ Tripsina: ____/____

() Incubar a microplaca a 37°C durante 24 hr. Estufa VARV: _____ Temp: _____

() Misturar 5 mL de amostra + 15 mL de MCPI 2,5% SFB e dispensar 200 µL em cada poço (menos os controles).

*Aliquotar 200 µL para ensaio de RT-qPCR – 0 hr!

() Descongelamento do vírus (PV): _____ vezes (2 µL em cada poço)

() Incubar a 37°C durante 2 h, retirar inóculo e adicionar 200 µL de MCPI 2,5% novo.

() Incubar a microplaca a 37°C durante 72 hr. Estufa VARV: _____

Início: ____/____ h Temp: _____ Término: ____/____ h Temp: _____

Observação da monocamada após 72 hr: Confluência: _____% (mín. 80%)

Fixação e coloração das placas

() Aspirar o meio com pipetador multicanal.

*Aliquotar 200 µL para ensaio de RT-qPCR – exceto os controles – 72 hr!

() Adicionar 100 µL de acetona 80% em cada poço e incubar por 15 minutos em banho de gelo. Acetona: Lote: ____/____

() Retirar a acetona e secar a microplaca.

() Adicionar 40 µL do conjugado em cada poço:

Cálculos para preparo do conjugado (Registro CQ _____) Marca: _____

• Volume total de anticorpo conjugado diluído: $V_t = (n^\circ \text{ de poços} + 2) \times 40$

$V_t = (\quad) \times 40 = \quad \mu\text{L}$

• Volume de conjugado puro: $V_{cp} = V_t / \text{título do conjugado}$

$V_{cp} = \quad / \quad = \quad \mu\text{L}$

• Volume de azul de Evans: $V_a = V_t - V_{cp}$

A. Evans Lote: ____/____

$V_a = \quad - \quad = \quad \mu\text{L}$

() Incubar a microplaca com anticorpo por: Estufa VARV: _____

() 30 min se BioRad ou () 60 min se Pasteur a 37°C. Temp: _____°C

() Lavar 2 vezes com 50 µL de PBS (deixar o último na placa). PBS: Lote: ____/____

() Selar a microplaca com filme de parafina plástica e embalar com papel-alumínio até a leitura.

Leitura

() Realizar a leitura em microscópio de imunofluorescência invertido em aumento de 200X e anotar as leituras no mapa de trabalho.

Responsável: _____ Data: ____/____/____

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is awarded to

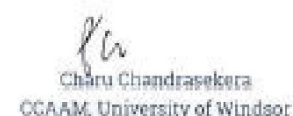
BEATRIZ LOURENCO CORREIA MOREIRA

for Oral Presentation at the 2nd Pan American Conference for
Alternative Methods in Rio de Janeiro from August 23rd to 24th, 2018.


José Mauro Granjeiro
INMETRO


Vanessa de Sá Rocha
Natura


Thomas Hartung
CAAT, John Hopkins


Charu Chandrasekera
CCAAM, University of Windsor

Steering Committee



Sponsors



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is awarded to

BEATRIZ LOURENCO CORREIA MOREIRA

for participation at the 2nd Pan American Conference for Alternative
Methods in Rio de Janeiro from August 23rd to 24th, 2018.


José Mauro Granjeiro
INMETRO


Vanessa de Sá Rocha
Natura


Thomas Hartung
CAAT, John Hopkins


Charu Chandrasekera
CCAAM, University of Windsor

Steering Committee



Sponsors



ANEXO 4 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NA II CONFERÊNCIA
PANAMERICANA PARA MÉTODOS ALTERNATIVOS

ANEXO 5 – CERTIFICADO DE RECEBIMENTO DE GRATIFICAÇÃO “YOUNG SCIENTIST TRAVEL AWARD” NO XXI CONGRESSO EM ALTERNATIVAS PARA TESTES EM ANIMAIS.




Young Scientists Travel Awards 2018

Beatriz Moreira

received a "Young Scientist Travel Award (YSTA) 2018"
and was selected by the Scientific Committee to present her contribution

Validation of an in vitro assay for the detection of residual viable
rabies virus in inactivated rabies vaccines.

at the "21st European Congress on Alternatives to Animal Testing".


Winfried Neuhaus
President of EUSAAT


Horst Spielmann
Secretary General of EUSAAT

The "Young Scientists Travel Awards" are funded and supported by:

EUSAAT
European Society for
Alternatives to Animal Testing
The European 3Rs Society

set
Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Erprobungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

TiSSUSE
Emulating Human Biology

ANEXO 6 – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO XXI CONGRESSO EM
ALTERNATIVAS PARA TESTES EM ANIMAIS.

EUSAAT

European Society for
Alternatives to Animal Testing

Laimbauerweg 15
A-4225 Lufenberg/Donau

LINZ 2018
21st European Congress on Alternatives to Animal Testing

EUSAAT 2018
18th Annual Congress of EUSAAT



European Society for
Alternatives to Animal Testing
The European 9Rs Society

www.eusaat-congress.eu

23 – 26 September 2018 – University of Linz, Austria

Linz, 26.09.2018

Confirmation of participation

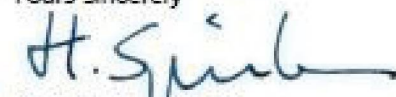
We confirm that

Beatriz Moreira

has participated in the 21st European Congress on Alternatives to Animal Testing – Linz 2018 & 18th Annual Congress of EUSAAT – EUSAAT 2018.

The congress included 51,75 hrs of lectures (33 parallel sessions and 3 plenary keynote lectures), 3 hrs of plenary round tables and 7,83 hrs poster presentations.

Yours sincerely



Prof. Dr. Horst Spielmann
Head of the Scientific Committee



Helmut Appl MSc
Congress office

ZVR-number: 451337343

Bank account: Bank Austria | bank code: 12000 | account number 00451099709 | IBAN: AT611200000451099709 | BIC: BKAUATWW

ANEXO 7 – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO À REVISTA *JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS*.



Beatriz Lourenço Correia <biaxuh@gmail.com>

Fwd: Your manuscript VIRMET_2019_11 has been sent for review

2 mensagens

Sonia Mara Raboni <sraboni@ufpr.br>

22 de fevereiro de 2019 21:29

Para: Beatriz Lourenço Correia <biaxuh@gmail.com>

De: "Journal of Virological Methods" <EviseSupport@elsevier.com>

Para: sraboni@ufpr.br

Enviadas: Sexta-feira, 22 de fevereiro de 2019 5:18:45

Assunto: Your manuscript VIRMET_2019_11 has been sent for review

This message was sent automatically.

Reference: VIRMET_2019_11

Title: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines.

Journal: Journal of Virological Methods

Dear Professor Raboni,

I am currently identifying and contacting reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer review is a voluntary service it can take time to find reviewers who are both qualified and available. While reviewers are being contacted, the status of your manuscript will appear in EVISE® as 'Reviewer Invited'.

Once a reviewer agrees to review your manuscript, the status will change to 'Under Review'. When I have received the required number of expert reviews, the status will change to 'Ready for Decision' while I evaluate the reviews before making a decision on your manuscript.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® and go to 'My Submissions' via: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=VIRMET

Kind regards,

Journal of Virological Methods

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our Customer Support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | Privacy Policy

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.